

Université de Sherbrooke

**Mécanismes moléculaires de différenciation des cellules dendritiques tolérogènes  
impliquées dans la protection contre le diabète de type 1**

Par  
Chantal Guindi

Programme d'immunologie  
Faculté de médecine et des sciences de la santé  
Laboratoire du Dr. Abdelaziz Amrani

Mémoire présenté à la faculté de médecine et des sciences de la santé  
En vue de l'obtention du grade de  
Maître ès Sciences (M. Sc.) en Immunologie

Le 15 janvier 2007



Library and  
Archives Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Published Heritage  
Branch

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file    Votre référence*

*ISBN: 978-0-494-31400-5*

*Our file    Notre référence*

*ISBN: 978-0-494-31400-5*

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

  
**Canada**

## Table des matières

Liste des tableaux et figures .....	V
Liste des abéviations.....	VII
1 Résumé .....	1
2 Introduction .....	2
2.1 Les cellules dendritiques.....	2
2.2 Processus de maturation des DCs .....	7
2.3 Les DCs et les maladies auto-immunes.....	10
2.4 Modèles d'études.....	11
2.5 Facteurs impliqués dans le développement du DT1.....	12
2.5.1 Facteurs environnementaux.....	12
2.5.2 Facteurs génétiques .....	13
2.6 Développement du diabète de type 1 .....	14
2.6.1 Les lymphocytes T.....	15
2.6.1.1 Les lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> .....	16
2.6.1.2 Les lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> .....	16
2.6.2 Les lymphocytes B.....	17
2.6.3 Implication des DCs dans le développement du DT1.....	18
2.7 Tolérance périphérique et DT1 .....	20
2.7.1 F4/80 .....	23
2.7.2 Les lymphocytes T régulateurs (Tregs).....	24
2.7.3 Les DCs dans la tolérance .....	25
2.8 Mécanismes moléculaires impliqués dans la génération des DCs.....	31
2.8.1 Implication de p38 .....	31
2.8.2 Implication de ERK .....	33
2.8.3 Implication de NF-κB .....	34
2.8.4 Implication de CREB .....	38
2.8.5 Implication de C/EBP .....	40
2.8.6 Implication d'AP-1 .....	42
3 Rationnelle.....	44
3.1 Objectifs de recherches.....	44
4 Matériel et méthodes.....	45
4.1 Souris.....	45
4.2 Génération des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (BMDCs) .....	45
4.3 Anticorps pour la cytométrie de flux.....	46
4.4 Essai d'activation des lymphocytes T .....	46
4.5 Essai de phagocytose.....	47

4.6	Immunobuvardage de type Western.....	47
4.7	Fractionnement cellulaire et extraction nucléaires.....	48
4.8	Gel de retardement (EMSA) .....	49
4.9	Production de cytokines par les BMDCs.....	50
5	Résultats: .....	51
5.1	Expression des molécules de co-stimulation par les DCs avant et après induction de la maturation par le LPS .....	51
5.2	Comparaison de la capacité d'activation des lymphocytes T par les différents types de DCs .....	54
5.3	Capacité de phagocytose des différents types de DCs .....	57
5.4	Expression de F4/80 par les différents types de DCs.....	59
5.5	Production de cytokines par les DCs.....	62
5.6	Activation des MAP kinases durant la génération des DCs tolérogènes.....	65
5.7	Activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B durant la génération des DCs tolérogènes .....	68
5.8	Activation de CREB et AP-1 durant la génération de DCs tolérogènes .....	73
5.9	Activation du facteur de transcription C/EBP durant la génération de DCs tolérogènes .....	77
6	Discussion.....	81
7	Conclusion.....	95
8	Remerciements .....	97
9	Références .....	98

## Liste des tableaux et figures

Tableau 1. Expression des TLR par les différentes sous-populations de DCs humaines et murines .....	6
Figure 1. Processus de maturation des DCs: changements phénotypiques et fonctionnels.	8
Figure 2. Représentation schématique des mécanismes impliqués dans la tolérance périphérique. ....	22
Figure 3. Mécanismes d'action des différents types de DCs tolérogènes.....	28
Figure 4. Représentation schématique des deux voies d'activation de NF- $\kappa$ B. ....	37
Figure 5. Analyse de l'expression des molécules de co-stimulation chez les différents types de DCs. ....	53
Figure 6. Analyse de la capacité d'activation des lymphocytes T par les différents types de DCs. ....	56
Figure 7. Analyse de la capacité de phagocytose des différents types de DCs. ....	58
Figure 8. Expression de F4/80 par les différents types de DCs.....	61
Figure 9. Sécrétion de cytokines pro et anti-inflammatoires par les différents types de DCs. ....	64
Figure 10. Analyse de l'activation des MAP kinases ERK1 et 2 et p38 chez les différents types de DCs. ....	67
Figure 11. Gel de retardement des protéines nucléaires des différents types de DCs avec une sonde spécifique pour NF- $\kappa$ B.....	70
Figure 12. Supershift avec des anticorps spécifiques pour différentes sous-unités de NF- $\kappa$ B. ....	72
Figure 13. Gel de retardement des protéines nucléaires des différents types de DCs avec une sonde spécifique pour AP-1. ....	74
Figure 14. Gel de retardement des protéines nucléaires des différents types de DCs avec une sonde spécifique pour CREB.....	76
Figure 15. Gel de retardement des protéines nucléaires des différents types de DCs avec une sonde spécifique pour C/EBP.....	78

Figure 16. Supershift avec des anticorps spécifiques pour les différents isoformes de C/EBP.....	80
--	----

## Liste des abréviations

APC	Cellule présentatrice d'antigène
AP-1	<i>Activator protein-1</i>
ATF1	<i>Activating transcription factor 1</i>
$\beta_2$ M	Bêta-2-microglobuline
BB	<i>Bio-Breeding</i>
BMDC	<i>Bone marrow derived dendritic cell</i>
CIITA	<i>Class II transactivator complex</i>
CCR	Récepteur de chimiokine de type CC
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
Ci	Unité de mesure de radioactivité (Curie)
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPM	Compte par minute
CRE	<i>cAMP regulated element</i>
CREB	<i>cAMP regulated element binding protein</i>
CREM	<i>cAMP regulated element modulator</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic lymphocyte antigen-4</i>
DC	Cellule dendritique
DT1	Diabète de type 1
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FBS	Sérum bovin fœtal
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
FLT3	<i>FMS-like tyrosine kinase</i>
FoxP3	<i>Forkhead box protein 3</i>
GAD	<i>Glutamate acid decarboxylase</i>
GITR	<i>Glucocorticoid-induced TNF-like receptor</i>
GM-CSF	<i>Granulocytes Macrophages Colony Stimulating Factor</i>
GM DCs	Cellules dendritiques générées avec du GM-CSF
Gy	Unité de mesure de radioactivité (Gray)
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> (CMH humain)

ICA512	<i>Islet cell antibody 52</i>
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IκB	Inhibiteur de NF-κB
IKK	Kinases de IκB
IL-	Interleukine
IL-4 Dcs	Cellules dendritiques générées avec du GM-CSF et de l'IL-4
LAG-3	<i>Lymphocyte activation gene protein-3</i>
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MFI	Intensité de fluorescence moyenne
NF-κB	Facteur nucléaire kappa B
NIK	<i>NF-κB inducing kinase</i>
NEMO	<i>NF-κB essential modulator</i> (autre nom IKK-γ)
NOD	Non obèse diabétique
NOR	Non obèse résistant
PBS	Tampon phosphate salin
PercP	<i>Peridinin-chlorophyll-protein complex</i>
SCID	<i>Severe combined immune deficiency</i>
TCR	Récepteurs des cellules T
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TH	<i>T helper</i>
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TSLP	<i>Thymic stromal lymphopoietin</i>
Treg	Lymphocytes T régulateurs
VIP	<i>Vasoactive intestinal peptide</i>



# 1 Résumé

Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune qui est caractérisée par la destruction des cellules bêta du pancréas. Les connaissances actuelles sur cette pathologie sont, en grande partie, facilitées par l'utilisation de modèles animaux tel que la souris NOD. Cette souche de souris développe de façon spontanée un diabète similaire à celui retrouvé chez l'homme. Les cellules bêta du pancréas sont détruites principalement par les lymphocytes T auto-réactifs. Normalement, ces derniers sont éliminés au niveau du thymus (tolérance centrale) ou maintenus dans un état naïf en périphérie (tolérance périphérique) afin de préserver la tolérance. Dans le cas de diabète de type 1, plusieurs anomalies des différents mécanismes de tolérance périphérique ont été rapportés. Nous avons démontré précédemment que l'injection de GM-CSF à des souris NOD permet de rétablir cette tolérance en favorisant la génération de cellules dendritiques tolérogènes. Ces cellules sont dans un état semi-mature et résistent à la maturation. De plus, elles produisent des quantités importantes d'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire qui inhibe l'activation des lymphocytes. Des transferts adoptifs ont permis de déterminer que ces cellules dendritiques sont essentielles à la protection contre le diabète de type 1.

Le but de ce projet est de développer et de caractériser un modèle *in vitro* de cellules dendritiques tolérogènes. Les résultats obtenus montrent que ces cellules résistent à la maturation puisqu'une faible augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation est observée. De plus, les cellules dendritiques générées *in vitro* possèdent une faible capacité d'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Les cellules dendritiques tolérogènes générées *in vitro* produisent des quantités importantes d'IL-10 et ne produisent pas de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12p70 et l'IFN- $\gamma$ . Pour comprendre ces différences, nous avons tenté de déterminer quels mécanismes moléculaires sont responsables de cette inhibition de la maturation et de la production des différentes cytokines. L'étude des MAP kinases a montré qu'il y a activation préférentielle de ERK chez les DC tolérogènes alors que les DC matures activent préférentiellement p38. L'étude des facteurs de transcription montre que les DC tolérogènes possèdent une activation importante de NF- $\kappa$ B mais seulement du dimère p52/p65 alors que les DCs matures possèdent une activation importante de NF- $\kappa$ B composé des dimères p52/p65 et p52/RelB. Dans les deux types de cellules, une activation similaire d'AP-1 et de CREB est observée. Les DCs tolérogènes possèdent une activation importante de C/EBP, un facteur de transcription qui n'est pas connu jusqu'à ce jour pour jouer un rôle dans la génération et la différenciation des DCs. Ensemble, ces résultats montrent que plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans la génération de DCs tolérogènes et que ces voies régulent le type de DCs obtenu. Une modulation des ces voies de signalisation *in vivo* permettrait possiblement de protéger les souris NOD contre le développement du diabète de type 1.

## 2 Introduction

### 2.1 Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DCs), sont des cellules présentatrices d'antigènes par excellence (Banchereau et coll., 2000). Ces cellules sont parmi les seules capables d'induire une réponse immune primaire permettant d'établir une mémoire immunologique (Banchereau et Steinman, 1998; Bell et coll., 1999; Hart, 1997). Les cellules dendritiques proviennent de précurseurs de la moelle osseuse et requièrent du GM-CSF (Granulocytes Macrophages Colony-Stimulating Factor) afin de se différencier en DCs (Inaba et coll., 1992; Scheicher et coll., 1992). Les DCs peuvent être retrouvées sous quatre stades de développement *in vivo*. Le premier stade de développement comprend les précurseurs de la moelle osseuse. Le deuxième stade comprend les précurseurs de DCs circulant dans le sang, la lymphe ainsi que dans les tissus lymphoïdes. Suite à l'exposition à des pathogènes, ces précurseurs vont produire des quantités importantes de cytokines. Le troisième stade comprend les DCs immatures résidant dans les tissus et qui possèdent une grande capacité phagocytaire. Le quatrième stade de développement comprend les cellules dendritiques matures que l'on retrouve dans les organes lymphoïdes secondaires. Celles-ci expriment des quantités importantes de molécules de co-stimulation ainsi que de molécules du CMH de classe II. Ces cellules sont responsables de la présentation d'antigènes aux lymphocytes (Banchereau et coll., 2000).

Deux voies de différenciation des cellules dendritiques ont été identifiées chez la souris ce qui donne deux types de DCs différents soit les DCs myéloïdes et les DCs lymphoïdes. Les DCs myéloïdes ont été découvertes suite à la culture *in vitro* de cellules de la moelle osseuse qui donne lieu à la génération de granulocytes/macrophages et de DCs en présence de GM-CSF (Inaba et coll., 1992; Scheicher et coll., 1992). Les DCs peuvent aussi provenir de précurseurs lymphoïdes. (Ardavin et coll., 1993; Saunders et coll., 1996; Vremec et coll., 1992; Wu et coll., 1996). Les DCs lymphoïdes et myéloïdes possèdent des phénotypes, une localisation tissulaire ainsi que des fonctions différentes. Les deux types de DCs expriment CD11c, des niveaux élevés de CMH de classe II, et de molécules de co-stimulation comme CD80, CD86 et CD40 suite à leur maturation (Banchereau et coll., 2000). Les DCs lymphoïdes expriment un homodimère de CD8 $\alpha$  (CD11c<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>) alors que les DCs myéloïdes ne l'expriment pas (CD11c<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>). Le CD8 $\alpha$  est donc un excellent marqueur permettant de différencier les deux types de DCs (Maraskovsky et coll., 1996a; Maraskovsky et coll., 1996b; Pulendran et coll., 1997; Vremec et Shortman, 1997; Wu et coll., 1996). D'autres marqueurs comme DEC 205 et CD1d sont fortement exprimés chez les DCs lymphoïdes de façon constitutive (Maraskovsky et coll., 1996a; Maraskovsky et coll., 1996b; Pulendran et coll., 1997; Vremec et Shortman, 1997; Wu et coll., 1996). Par contre, leur expression peut être induite chez les DCs myéloïdes en culture *in vitro* (Maraskovsky et coll., 1996a; Maraskovsky et coll., 1996b; Pulendran et coll., 1997; Vremec et Shortman, 1997; Wu et coll., 1996). Les DCs lymphoïdes sont retrouvées dans la zone riche en lymphocytes T située dans les tissus lymphatiques périartériolaires de la rate et des ganglions lymphatiques (De Smedt et coll., 1996; Leenen et coll., 1998; Pulendran et coll., 1997).

Les DCs myéloïdes sont plutôt retrouvées dans la zone marginale de la rate (De Smedt et coll., 1996; Leenen et coll., 1998; Pulendran et coll., 1997). Au niveau fonctionnel, les DC lymphoïdes produisent plus de cytokines comme l'IL-12 (Maldonado-Lopez et coll., 1999; Ohteki et coll., 1999; Pulendran et coll., 1997; Reis e Sousa et coll., 1997) et sont moins aptes à phagocyter des antigènes que les DCs myéloïdes (Leenen et coll., 1998; Pulendran et coll., 1997). *In vitro*, les DCs lymphoïdes sont moins aptes à induire l'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> allogéniques que les DCs myéloïdes (Kronin et coll., 1996; Suss et Shortman, 1996).

Les sous-populations de DCs peuvent aussi exprimer différents TLR (Toll Like receptors), ce qui leur permettent de répondre à différents stimuli. Le tableau 1 présente les niveaux d'expression de ces différents TLR par les sous-populations de DCs humaines et murines. Ce tableau permet de constater que les DCs myéloïdes murines expriment plus le TLR3 que les DCs plasmocytoïdes murines. Les DCs plasmocytoïdes murines expriment plus le TLR7 que les DC myéloïdes. La stimulation de ces TLR peut entraîner la production de médiateurs différents. Par exemple, lorsque le TLR7 exprimé par les DCs plasmocytoïdes humaines est stimulé, une production d'interféron de type 1 est observée alors qu'aucune production d'IL-12 n'est observée. Par contre, lorsque le TLR7 des DCs myéloïdes humaines est activé par le même stimulus, une production d'IL-12 est observée alors qu'aucune production d'interféron de type 1 est observée (Mazzoni et Segal, 2004). Ces différences permettent aux sous-populations de DCs de répondre à différents stimuli et donc d'activer différents types cellulaires pour établir une réponse immune appropriée. De plus, les sous-populations de DCs réagissent

différemment selon le TLR activés. Par exemple, des DCs stimulées avec de l'ARN double brin, un activateur du TLR3, produiront des interférons de type 1 impliqués dans la réponse immunitaire anti-virale. Si ces mêmes DCs sont stimulées avec un dérivé bactérien comme le LPS, qui active le TLR4, aucune production d'interféron de type 1 sera observée (Mazzoni et Segal, 2004).

	TLR1	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR6	TLR7	TLR8	TLR9
Human DC Subsets									
Myeloid:	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CD11c+, CD14-, CD1a+									
Plasmacytoid:	+	-	-	-	-	+	+	-	+
CD11c-, BDCA2+, CD123+									
Mouse DC Subsets									
Classical:									
LY6C- B220-									
CD4- CD8+ CD11b-	+	+	+	+	+/-	+	-	+	+
CD4- CD8- CD11b+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CD4+ CD8- CD11b+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+
Plasmacytoid:									
LY6C+ B220+ CD11b-	+	+	-	+/-	+	+	+	+	+
Langerhans-like:									
CD8-int CD11b+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Tableau 1. Expression des TLR par les différentes sous-populations de DCs humaines et murines

Niveau d'expression des TLR (Toll-like receptors) par les différentes sous-populations de cellules dendritiques humaines et murines (nd : non déterminé). Extrait de (Mazzoni et Segal, 2004)

## 2.2 Processus de maturation des DCs

La phagocytose par les cellules dendritiques immatures induit des changements phénotypiques et fonctionnels chez celles-ci, ce qui permet aux cellules ayant capté un antigène d'être en mesure de le présenter aux lymphocytes T (figure 1). La maturation des DCs est un processus continu s'initiant suite à la phagocytose d'un pathogène et qui se termine lors de l'activation des lymphocytes T.

Les DCs immatures ont une grande capacité de capture d'antigènes grâce à plusieurs mécanismes, comme la macropinocytose (Banchereau et coll., 2000) et l'endocytose médiée par des récepteurs comme les récepteurs Fcγ (Fanger et coll., 1996), les récepteurs de mannose et DEC-205 (Engering et coll., 1997; Jiang et coll., 1995; Mommaas et coll., 1999; Reis e Sousa et coll., 1997; Sallusto et coll., 1995; Tan et coll., 1997). Ainsi, les DCs immatures peuvent aussi phagocyter des particules comme des billes de latex (Matsuno et coll., 1996), des fragments de cellules apoptotiques ou nécrotiques (Albert et coll., 1998a; Albert et coll., 1998b; Rubartelli et coll., 1997), des virus et des bactéries (Inaba et coll., 1993; Rescigno et coll., 1998) ainsi que des parasites intra-cellulaires (Arnold-Schild et coll., 1999; Todryk et coll., 1999).

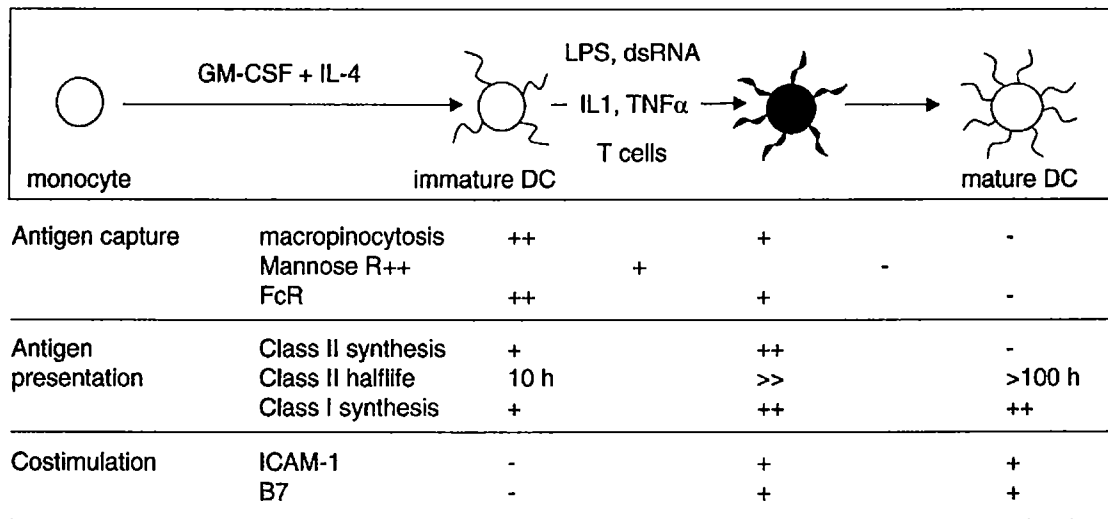


Figure 1. Processus de maturation des DCs: changements phénotypiques et fonctionnels.

Les DCs immatures ont une grande capacité de phagocytose grâce à la macropinocytose et à l'expression de plusieurs molécules dont les récepteurs mannoses et les récepteurs Fc. Suite à la maturation, les DCs perdent cette capacité de phagocytose dû à une diminution de l'expression de ces molécules. Les DCs matures possèdent une plus grande expression des molécules de CMH de classe I et II ainsi que des molécules de co-stimulation que les DCs immatures. Adapté de (Sallusto et Lanzavecchia, 2002)



Parmi les changements phénotypiques et fonctionnels accompagnant la maturation des DCs, on note la perte de la capacité de phagocytose due à une diminution de l'expression des récepteurs médiant la phagocytose comme les récepteurs Fc et les récepteurs de mannose (Banchereau et coll., 2000) (figure 1). Les DCs immatures accumulent des quantités importantes de molécules de CMH de classe II au niveau des vésicules intracellulaires (Inaba et coll., 1997; Kleijmeer et coll., 1995). Les antigènes captés par les DCs sont ensuite dirigés vers ces vésicules ce qui promouvoit le détachement de la chaîne invariante associée au CMH de classe II et qui permet au CMH de lier les peptides formés à partir de l'antigène phagocyté (Castellino et coll., 1997; Cresswell, 1996). La maturation des DCs implique un export massif des molécules de CMH de classe II et des molécules de co-stimulation au niveau de la membrane plasmique (Banchereau et coll., 2000). Les molécules de CMH de classe II sont rapidement internalisés chez les DCs immatures alors que chez les DCs matures, ces molécules peuvent rester pendant plusieurs jours à la surface des DCs (Cella et coll., 1997; Inaba et coll., 1997; Pierre et coll., 1997; Winzler et coll., 1997). Le processus de maturation des DCs est aussi caractérisé par l'augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation comme celles de la famille B7 (B7.1 ou CD80 et B7.2 ou CD86). *In vitro*, la maturation des DCs peut être induite par plusieurs stimuli comme le LPS, le CD40, le FLT3 et les cytokines pro-inflammatoires (Bell et coll., 1999).

## 2.3 Les DCs et les maladies auto-immunes

Les DCs représentent un type cellulaire particulier spécialisé dans la présentation d'antigène ainsi que dans l'activation des lymphocytes. Plusieurs maladies auto-immunes résultent de l'activation de lymphocytes auto-réactifs et de la production d'auto-anticorps. Par exemple, des études récentes démontrent que les DCs sont impliquées dans le développement du lupus érythémateux. Cette pathologie est caractérisée par une activation anormale des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ce qui résulte en une activation importante de lymphocytes B produisant des auto-anticorps (Decker et coll., 2006; Ding et coll., 2006). Une étude montre que les DCs générées à partir des monocytes de patients atteints du lupus sont dans un état de maturation anormal caractérisé par une augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation ainsi que du CMH de classe II (Ding et coll., 2006). Dans le cas de la maladie de Graves, il a été démontré que les DCs jouaient un rôle très important dans le développement de l'hyperthyroïdite caractéristique de cette pathologie. Lorsque des DCs surexpriment le récepteur à la thyrotrophine (TSHR), le principal auto-antigène de cette pathologie, et que ces DCs sont transférées à des souris Balb/C, non susceptibles à cette pathologie, on observe une production importante d'auto-anticorps reconnaissant le TSHR (Kita-Furuyama et coll., 2003).

Au laboratoire, nous étudions le diabète de type 1 (DT1), une maladie auto-immune caractérisée par la destruction des cellules bêta du pancréas, responsables de la production d'insuline. Les DCs jouent un rôle important dans l'initiation de cette pathologie puisqu'elles sont parmi les premières cellules à infiltrer les îlots de

Langerhans. Les sections suivantes décrivent plus précisément cette pathologie ainsi que l'implication de plusieurs types cellulaires dans cette maladie.

## 2.4 Modèles d'études

Le rat BB (bio-breeding) et la souris NOD (non obèse diabétique) sont les modèles les plus connus et utilisés pour l'étude du diabète de type 1. Les premières colonies de rat BB ont été établies au Canada dans les années 70. Ces rats développent de façon spontanée le diabète de type 1 et souffrent de lymphopénie (Yang et Santamaria, 2006).

La souris NOD fut découverte en 1974 au « Shionogi Research Laboratories » à Osaka au Japon (Hanafusa et coll., 1994). Au départ, les chercheurs voulaient développer une souche de souris qui développerait des cataractes, sur un fond génétique de souris « Swiss » (Jcl-ICR) (Solomon et Sarvetnick, 2004). Les chercheurs ont plutôt découvert que les souris qui ne développaient pas de cataractes avaient une hyperglycémie. Après plusieurs croisements ciblés, la lignée de souris NOD est apparue. La souris NOD développe spontanément un diabète similaire en plusieurs points à celui retrouvé chez l'humain (Atkinson et Leiter, 1999; Hanafusa et coll., 1994).

## 2.5 Facteurs impliqués dans le développement du DT1

Plusieurs facteurs génétiques et environnementaux sont responsables de la prédisposition de certains individus au développement du diabète de type 1.

### 2.5.1 Facteurs environnementaux

Le diabète de type 1 est une pathologie dont la fréquence est grandissante. L'incidence globale augmente d'environ 3 % par année et l'incidence prédite en 2010 sera 40% plus élevée que celle observée en 1998 (Onkamo et coll., 1999). L'incidence est aussi plus importante dans les pays industrialisés de l'Amérique du Nord et de l'Europe où l'on retrouve la majorité des cas (Gillespie, 2006). De plus, un enfant né en Finlande a 40 % plus de chances de développer le diabète de type 1 qu'un enfant né au Vénézuéla (Gillespie, 2006). Comme la majorité des cas sont observés dans les pays industrialisés, plusieurs chercheurs croient que l'hygiène est aussi impliquée dans le développement de la pathologie. L'hypothèse de l'hygiène stipule que l'exposition à certains pathogènes en bas âge permet de développer une réponse immunitaire innée qui pourrait supprimer l'auto-immunité (Bach, 2005; Gale, 2002). Les enfants nés dans les pays industrialisés sont de moins en moins exposés à différents pathogènes, ce qui augmenterait le développement des maladies auto-immunes. Plusieurs facteurs environnementaux sont impliqués dans l'apparition de cette pathologie comme le régime alimentaire et le stress (Bach, 2005). Plusieurs infections virales causées par les entérovirus (coxsackies B) (Hyoty, 2002), les rotavirus (Honeyman et coll., 2000) et le virus de la rubéole (Gillespie,

2006) sont parmi les plus susceptibles de causer l'apparition du diabète de type 1. Le développement du diabète de type 1 implique un ou plusieurs de ces facteurs, cependant, il est difficile de déterminer exactement l'implication de chacun de ces facteurs dans le développement du diabète de type 1.

### 2.5.2 Facteurs génétiques

Plusieurs facteurs génétiques sont aussi responsables de la prédisposition de certains individus au développement du DT1. Le premier locus associé au DT1 est celui qui code pour le HLA (human leukocyte antigen) situé sur le chromosome 6 (Cudworth et Woodrow, 1975; Nerup et coll., 1974). Ce gène serait responsable de la moitié des cas familiaux du DT1 (Risch, 1987; Todd, 1995{Risch, 1987 #166). Deux haplotypes du HLA sont particulièrement importants pour le DT1 soit le HLA-DQ8 et DR3-DQ2 qui sont retrouvés chez 90% des patients atteints de diabète de type 1 (Devendra et Eisenbarth, 2003). Un autre facteur de susceptibilité est associé au gène de l'insuline situé sur le chromosome 11 (Bell et coll., 1984). Le promoteur du gène de l'insuline comprend des séquences tandems répétées. Un faible nombre de ces séquences est associé à une prédisposition pour le DT1, tandis qu'un nombre élevé est associé à une protection contre le DT1 (Bennett et coll., 1995). D'autres gènes sont associés à la susceptibilité au DT1. Parmi ceux-ci, il y a le gène retrouvé sur le chromosome 2q33 qui encode pour la protéine CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4). Celle-ci est impliquée dans la régulation de l'activation des lymphocytes T (Ueda et coll., 2003). On

retrouve aussi un polymorphisme au niveau du promoteur du gène codant pour l'IL-12 (Graham et coll., 2002; Kelly et coll., 2003).

Chez la souris NOD, plusieurs locus ont été associés au développement du DT1. Plusieurs de ces locus sont retrouvés sur le chromosome 1 (*Idd5*) et sur le chromosome 4 (*Idd9*) et ils comportent plusieurs gènes impliqués dans la co-stimulation des lymphocytes T comme: Casp8, Cd28, Ctla-4, Icos, Bcl2, Cd30, Tnfr2 et Cd137 (Hill et coll., 2000; Lyons et coll., 2000). Plusieurs gènes associés au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) sont aussi associés à la susceptibilité au DT1 (Yang et Santamaria, 2006). Sur le chromosome 2 de la souris, il y a le gène qui code pour la  $\beta$ 2-microglobuline ( $\beta$ 2m). Un polymorphisme dans ce gène peut soit entraîner une prédisposition ( $\beta$ 2m<sup>a</sup>) ou soit une résistance ( $\beta$ 2m<sup>b</sup>) contre le DT1 (Hamilton-Williams et coll., 2001).

## 2.6 Développement du diabète de type 1

Avant l'apparition des symptômes cliniques caractéristiques du diabète de type 1, il y a une phase pré-clinique. Cette phase de la pathologie est caractérisée par une infiltration de cellules mononuclées autour des îlots de Langerhans aussi appelée péri-insulite (Fujino-Kurihara et coll., 1985). La péri-insulite est détectée chez les mâles et les femelles NOD dès l'âge de deux à trois semaines. Les premières cellules infiltrantes sont des cellules présentatrices d'antigènes (APC) comme les macrophages et les cellules dendritiques (Mathis et coll., 2001). Elles sont suivies par des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, T

CD8<sup>+</sup>, des lymphocytes B (Jansen et coll., 1994) et parfois des cellules « Natural Killer » (NK) (Miyazaki et coll., 1985). Cette phase progresse lentement et peut être observée jusqu'à l'âge d'environ 12 semaines chez la souris. À ce stade, il n'y a pas de destruction des cellules bêta du pancréas. Cette phase n'est pas détectée chez les humains, car les symptômes apparaissent bien après celle-ci (Solomon et Sarvetnick, 2004). Chez la souris NOD, dès l'âge de 14 semaines, l'insulite non-destructrice progresse vers une insulite agressive menant à la destruction des cellules bêta du pancréas. Il y a donc bris de la tolérance périphérique aux antigènes dérivés des cellules bêta (Andre et coll., 1996; Dilts et Lafferty, 1999). L'hyperglycémie, symptôme important du DT1, est observée lorsque 90% des cellules bêta sont détruites. À l'âge de 30 semaines, 80 % des souris femelles et environ 20% des souris mâles ont développé le DT1 (Solomon et Sarvetnick, 2004).

L'importance des diverses populations leucocytaires dans le développement du diabète de type 1 chez la souris NOD a fait l'objet de plusieurs études qui seront décrites dans les sections suivantes.

### 2.6.1 Les lymphocytes T

Plusieurs évidences indiquent que les lymphocytes T sont essentiels au développement du DT1. Par exemple, il a été démontré que la déplétion des lymphocytes T par l'injection d'un anticorps anti-CD3, une molécule exprimée par tous les lymphocytes T, à des souris NOD prévient le développement du diabète (Hayward et

Shreiber, 1989). De plus, il a été démontré que les deux types de lymphocytes T soit les CD4<sup>+</sup> et les CD8<sup>+</sup> sont essentiels au transfert de la pathologie chez des jeunes souris NOD (moins de 3 semaines) (Bendelac et coll., 1987).

#### 2.6.1.1 Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont très importants dans le développement du diabète de type 1. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont essentiels pour l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> qui pourront ensuite retourner au niveau des îlots et avoir une activité cytotoxique envers les cellules bêta (Solomon et Sarvetnick, 2004). En conséquence, des souris NOD déplétées en lymphocytes T CD4<sup>+</sup> soit par une mutation génétique au niveau de la molécule CD4 soit par l'utilisation d'anticorps bloquant sont protégées contre le développement de la pathologie (Shizuru et Fathman, 1993).

#### 2.6.1.2 Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>

Des études ont montré que les souris NOD déficientes en  $\beta$ 2-microglobuline ( $\beta$ 2m-null), qui n'expriment pas de CMH de classe I et donc déficientes en lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, ne développent pas d'insulite ni de diabète (Katz et coll., 1993). De plus, ces souris développent le diabète moins rapidement que les souris NOD lorsqu'on leur transfère des splénocytes de souris diabétiques (Katz et coll., 1993; Serreze et coll., 1997). D'autres études ont montré que des souris NOD injectées avec un anticorps



bloquant dirigé contre la molécule CD8 sont protégées contre le développement du DT1 (Katz et coll., 1993). Il a été démontré que des lignées cellulaires ou des clones de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> réactifs contre des antigènes des îlots de pancréas sont hautement diabétogènes lorsque transférés chez des souris immunodéficientes (NOD-SCID) (Wong et coll., 1995) et détruisent les cellules des îlots via une interaction Fas/Fas ligand (Amrani et coll., 1999; Nagata et coll., 1994).

### 2.6.2 Les lymphocytes B

Les lymphocytes B ont un double rôle à jouer dans le développement du diabète de type 1 chez la souris NOD. Leur premier rôle consiste à présenter certains auto-antigènes provenant des cellules bêta du pancréas comme par exemple, la protéine GAD (glutamic acid decarboxylase) (Falcone et coll., 1998; Serreze et coll., 1998) et ainsi permettre l'activation des lymphocytes T auto-réactifs (Serreze et coll., 1998). La deuxième fonction des lymphocytes B est de sécréter des auto-anticorps. Chez les patients pré-diabétiques ou nouvellement diagnostiqués, des quantités importantes d'auto-anticorps dirigés contre l'insuline (Palmer et coll., 1983), la protéine GAD (Baekkeskov et coll., 1990; Baekkeskov et coll., 1982) et la protéine tyrosine phosphatase IA2 (insulinoma-associated protein 2)/ICA512 (islet cell antibody 512) (Christie et coll., 1994; Hawkes et coll., 1996; Solimena et coll., 1996) sont retrouvées dans le sang. De plus, des souris déficientes en chaîne lourde des IgM (Igμ<sup>-/-</sup>), donc n'ayant aucun lymphocyte B mature (Kitamura et coll., 1991) sont protégées contre le développement du diabète de type 1 (Serreze et coll., 1996; Wong et coll., 1998).

### 2.6.3 Implication des DCs dans le développement du DT1

Les cellules dendritiques et les macrophages sont parmi les premières cellules à infiltrer les îlots de Langerhans (Mathis et coll., 2001). Lors du développement normal de la souris, un remodelage des îlots de Langerhans a lieu peu de temps après la naissance de la souris. Ce remodelage entraîne l'apoptose de certaines cellules bêta du pancréas (Finegood et coll., 1995; Petrik et coll., 1998; Scaglia et coll., 1997; Trudeau et coll., 2000). Des cellules dendritiques immatures infiltrer alors les îlots et phagocytent les corps apoptotiques (Steinman et coll., 2000). Ces DCs vont migrer jusqu'aux ganglions lymphatiques pancréatiques et présentent des auto-antigènes aux lymphocytes T. Les souris NOD possèdent un haplotype spécifique du CMH de classe II, I-Ag7, favorisant la présentation de plusieurs auto-antigènes (Ridgway et Fathman, 1999). Cette molécule est essentielle au développement de la pathologie, puisqu'une seule mutation dans cette protéine protège la souris NOD contre le développement de la maladie (Wicker et coll., 1987).

Plusieurs groupes ont étudié les cellules dendritiques des souris NOD. Tout d'abord, les travaux de Feili-Hariri et coll. ont permis de démontrer que les cellules de la moelle osseuse de souris NOD cultivées *in vitro* en présence de GM-CSF et d'IL-4 sont dans un état de maturation plus avancé que les DCs de souris non susceptibles au développement du diabète de type 1 (Feili-Hariri et Morel, 2001). De plus, ces travaux ont démontré que l'on obtient un nombre inférieur de DCs à partir de la moelle osseuse

de souris NOD comparativement à d'autres souches de souris. La diminution importante du nombre de DCs chez la souris NOD pourrait, selon les auteurs, diminuer la capacité des DCs à induire une tolérance périphérique (Feili-Hariri et Morel, 2001).

Plusieurs groupes ont aussi rapporté des anomalies des cellules dendritiques de la souris NOD. En 2004, le groupe de Leenen a rapporté que la génération de DCs à partir de la moelle osseuse avec du GM-CSF générait un nombre de DCs inférieur à celui obtenu avec d'autres types de souris comme les C57BL/6 et les Balb/C et que les DCs de souris NOD avaient un taux d'apoptose plus élevé comparativement aux souris NOR (non obèse résistante, souris congéniques aux NOD mais qui ne développent pas le diabète de type 1) (Nikolic et coll., 2004). La majorité des cellules ainsi générées, avait un phénotype et des fonctions se rapprochant plus de celles des macrophages que de DCs. Les quelques DCs obtenues à partir de souris NOD avaient un phénotype de cellules dendritiques matures mais elles étaient incapables d'induire l'activation des lymphocytes T. Cette étude a révélé que chez les souris NOD, il y a un dérèglement dans la génération de DCs et qu'il y a une génération préférentielle de macrophages *in vitro*. De façon similaire, le même groupe a étudié la différenciation des monocytes en DCs et a démontré que les monocytes de souris NOD se différencient préférentiellement en macrophages *in vivo* et non en DCs (Nikolic et coll., 2005).

## 2.7 Tolérance périphérique et DT1

La tolérance périphérique est assurée par plusieurs mécanismes qui préviennent normalement l'activation des lymphocytes T auto-réactifs. Cependant, chez la souris NOD, la plupart de ces mécanismes ne sont pas fonctionnels à leur plein potentiel. Le premier mécanisme de tolérance périphérique est l'ignorance immunologique (figure 2). Dans ce mécanisme, une barrière anatomique empêche les lymphocytes T auto-réactifs de rencontrer leurs antigènes. Le pancréas de la souris NOD n'offre pas ce type de protection, au contraire, les cellules immunitaires y pénètrent dès le jeune âge de la souris (Mathis et coll., 2001). Le deuxième mécanisme est la délétion clonale (figure 2). Lors de l'activation des lymphocytes T auto-réactifs, il peut aussi y avoir liaison de Fas et de Fas ligand, exprimé respectivement par le lymphocyte T et par la cellule présentatrice d'antigène (figure 2). Cette liaison entraîne l'apoptose du lymphocyte. Des analyses chez la souris NOD ont montré que l'expression de Fas est diminuée chez les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> (Decallonne et coll., 2003). Cette faible expression de Fas peut être responsable de la quantité importante de lymphocyte T auto-réactifs circulants retrouvés chez la souris NOD (Decallonne et coll., 2003). Un autre mécanisme de tolérance périphérique nécessite l'expression de la protéine CTLA-4 par les lymphocytes T. Les cellules présentatrices d'antigènes expriment des molécules de la famille B7 soit B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86), ces molécules lient la molécule CD28 retrouvée sur les lymphocytes T. Cette liaison fournit au lymphocyte le deuxième signal essentiel à son activation. CTLA-4 est une molécule qui peut aussi lier les molécules de la famille B7 (Kamradt et Mitchison, 2001). Lorsqu'il y a liaison de CTLA-4, il y a inhibition de l'activation du lymphocyte T. Plusieurs études ont démontré qu'il y a une diminution de

l'expression de CTLA-4 au niveau des lymphocytes T chez la souris NOD (Ueda et coll., 2003). Le dernier mécanisme de la tolérance périphérique est médié par les lymphocytes T régulateurs (figure 2). Des études ont démontré que les lymphocytes T régulateurs peuvent entourer les DCs, et ainsi, empêcher les lymphocytes T naïfs d'avoir accès aux molécules de co-stimulation et aux molécules de CMH portant des peptides auto-réactifs (Tang et coll., 2006). Les lymphocytes T régulateurs peuvent aussi produire des cytokine comme l'IL-10 et du TGF- $\beta$  qui inhibent la prolifération des lymphocytes T naïfs. Cependant, il a été démontré que chez les souris NOD, il y a une diminution du nombre de lymphocytes T régulateurs chez la souris NOD (Kukreja et coll., 2002).

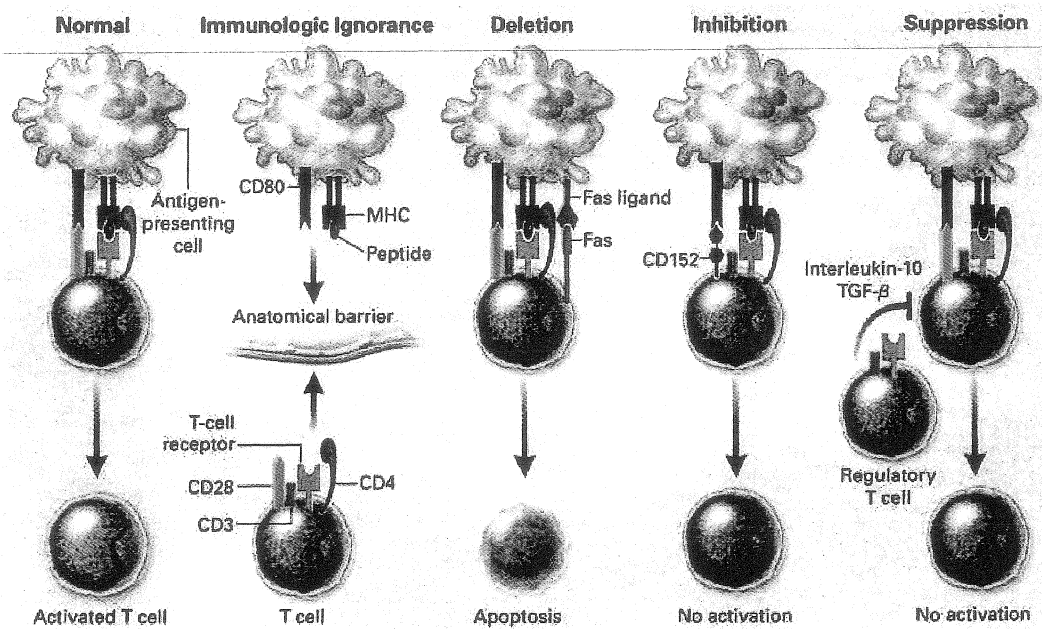


Figure 2. Représentation schématique des mécanismes impliqués dans la tolérance périphérique.

Plusieurs mécanismes empêchent normalement les lymphocytes T auto-réactifs de trouver son antigène. Parmi ces mécanismes il y a l'ignorance immunologique, la déletion clonale, l'inhibition de l'activation du lymphocyte ainsi que les lymphocytes T régulateurs. Extrait de (Kamradt et Mitchison, 2001)

### 2.7.1 F4/80

La molécule F4/80 est une glycoprotéine de 160 kDa normalement exprimée à la surface des macrophages. Cette molécule peut aussi être exprimée par certains types de cellules dendritiques comme, par exemple, les cellules de Langerhans, quelques cellules dendritiques myéloïdes et celles de la pulpe rouge de la rate (van den Berg et Kraal, 2005). L'expression de F4/80 par les cellules dendritiques est perdue lorsqu'elles deviennent matures (van den Berg et Kraal, 2005). Le groupe de Stein-Streilein a démontré que la molécule F4/80 est essentielle au maintien et à l'induction de la tolérance (Lin et coll., 2005). Pour ce faire, des souris n'exprimant pas la molécule F4/80 ont été générées (Lin et coll., 2005). Par la suite, de l'ovalbumine a été introduit dans la chambre antérieure d'un oeil des souris. Ce type de manipulation induit une tolérance à cet antigène chez les souris contrôles tandis qu'une réponse immunitaire contre cet antigène s'est développée chez les souris déficientes en F4/80 (Lin et coll., 2005). Ces travaux ont aussi démontré que les souris déficientes en F4/80 avaient un nombre réduit de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> régulateurs par rapport aux souris contrôles exprimant F4/80. Ces résultats suggèrent que F4/80 serait donc responsable de l'activation et/ou du maintien des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> régulateurs (Lin et coll., 2005). Cependant, le mécanisme par lequel F4/80 médie la tolérance n'est pas encore connu, en partie par le fait que le ligand de F4/80 est encore inconnu à ce jour (van den Berg et Kraal, 2005).

### 2.7.2 Les lymphocytes T régulateurs (Tregs)

Les lymphocytes T régulateurs sont caractérisés par l'expression des molécules CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> et du facteur de transcription FoxP3 (Chen, 2006). Ces lymphocytes expriment aussi à leur surface CD62L, CD45RB<sup>low</sup>, GITR<sup>high</sup>, LAG<sup>3th</sup>, LAP/TGF-β<sup>+</sup> et CTLA-4<sup>+</sup> (Chen, 2006). Ces derniers marqueurs ne sont pas seulement exprimés sur les lymphocytes T régulateurs mais aussi sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés via leur TCR (Chen, 2006).

Il existe deux types de lymphocytes T régulateurs soient les Tregs « natural occurring » et les Tregs induits (Lan et coll., 2005). Les lymphocytes T régulateurs induits sont issus de la différenciation des lymphocytes T naïfs en présence de cytokines anti-inflammatoires comme de l'IL-10 ou le TGF-β (Lan et coll., 2005) ou par contact avec des DCs de type tolérogènes (Rutella et coll., 2006) (discuté plus bas). Les lymphocytes T régulateurs naturels, sont produits au niveau du thymus et exportés au niveau de la périphérie et au niveau des organes lymphatiques secondaires (Lan et coll., 2005).

Les lymphocytes T régulateurs ont la particularité d'être anergiques lors d'une stimulation via leur TCR et ne produisent pas d'IL-2 (Shevach, 2001). Les lymphocytes T régulateurs ont la capacité d'inhiber la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> lorsque ces derniers sont activés par un peptide (Chen, 2006). Chez les patients atteints de diabète de type 1, une étude a démontré qu'il y a une diminution importante des lymphocytes Tregs dans leur sang (Kukreja et coll., 2002). Une autre étude (Brusko



et coll., 2005) montre cependant que les patients atteints de DT1 ont le même pourcentage de Tregs dans le sang, cependant, leur fonctionnalité serait inférieure à celle des sujets sains (Brusko et coll., 2005).

Le mécanisme par lequel les Tregs inhibent la prolifération des lymphocytes T a été clarifiée chez la souris NOD. Le groupe de Tang (Tang et coll., 2006) a démontré que dans les ganglions lymphatiques pancréatiques et dans la rate, les Tregs entourent les cellules dendritiques empêchant ainsi la présentation d'antigènes aux lymphocytes T. D'autres études ont montré que la suppression de la prolifération peut être médiée par plusieurs molécules comme CTLA-4 (Chen, 2006), GITR (Shimizu et coll., 2002) et le TGF- $\beta$ .

Le TGF- $\beta$  est indispensable à l'immunosuppression (Chen, 2006). Les lymphocytes T regs expriment une forme membranaire du TGF- $\beta$  (LAP-TGF- $\beta$ ), ainsi que le récepteur II du TGF- $\beta$  (T $\beta$ RII). Ces molécules permettent l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T naïfs après une stimulation via le TCR (McHugh et coll., 2002).

### 2.7.3 Les DCs dans la tolérance

Les cellules dendritiques jouent un rôle important dans la tolérance centrale au niveau du thymus. Les DCs présentent des antigènes aux lymphocytes T et sont impliquées dans la sélection négative de ces derniers (Matzinger et Guerder, 1989).

Plusieurs types de cellules dendritiques impliquées dans la tolérance périphérique ont aussi été décrites dans la littérature. Dans des conditions non-inflammatoires, les DCs peuvent présenter des antigènes aux lymphocytes T et induire leur anergie (Steinman et coll., 2000). Les DCs peuvent phagocyter des corps apoptotiques, migrer aux niveaux des ganglions et arrêter leur maturation dans un stade semi-mature (Rutella et coll., 2006). Le phénotype des cellules dendritiques semi-matures est caractérisé par une forte expression des molécules de co-stimulation et des molécules du CMH de classe II, mais au lieu de produire de l'IL-12, ces DCs produisent des quantités importantes d'IL-10 (Figure 3) (Rutella et coll., 2006). Un autre type de DCs tolérogènes sont les DCs qui résident dans des environnements favorisant la tolérance, comme par exemple dans les muqueuses ou dans des sites immuno-privilégiés tels que la chambre antérieure de l'oeil et les poumons. Ces DCs ont un phénotype matures, sécrètent de l'IL-10 mais pas d'IL-12 tout en favorisant le développement des Tregs qui produiront à leur tour de l'IL-10 (Lutz et Schuler, 2002). Un troisième type de DCs tolérogènes sont les DC matures, c'est-à-dire qu'elles expriment fortement les molécules de co-stimulation et les molécules de CMH de classe II et produisent des quantités importantes d'IL-12 (Figure 3) (Rutella et coll., 2006). Ces DCs peuvent générer des peptides «tolérogéniques», et qui, lorsque présentés aux lymphocytes Tregs, induisent la prolifération et l'expansion de lymphocytes T régulateurs pré-existants et spécifiques pour cet antigène (Quaratino et coll., 2000).

Les DCs immatures ou semi-matures peuvent permettre la conversion de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs en lymphocytes T régulateurs produisant de l'IL-10 (Battaglia

et coll., 2006; Vigouroux et coll., 2004). Ces DCs exprimeraient une molécule régulatrice, encore inconnue, qui permettrait cette différenciation des lymphocytes T effecteurs en lymphocytes T régulateurs (Vigouroux et coll., 2004). Récemment, une étude a démontré que des APC exprimant fortement Jagged-1, le ligand de Notch, induisent des lymphocytes T régulateurs qui produisent du TGF- $\beta$  et ce, *in vitro* et *in vivo* (Yvon et coll., 2003). Pour ce faire, les auteurs ont transfecté, à l'aide d'un système adénoviral, des lymphocytes B afin que ces derniers expriment fortement Jagged-1. Par la suite, ces cellules ont été mis en contact avec des lymphocytes T naïfs. La production de cytokines comme l'IL-2 et l'IFN- $\gamma$  est fortement réduite lorsque les lymphocytes T sont stimulés par des cellules surexprimant Jagged-1 comparativement aux contrôles. De plus, les auteurs ont observé une production importante de TGF- $\beta$  par les lymphocytes T stimulés avec les cellules surexprimant Jagged-1.

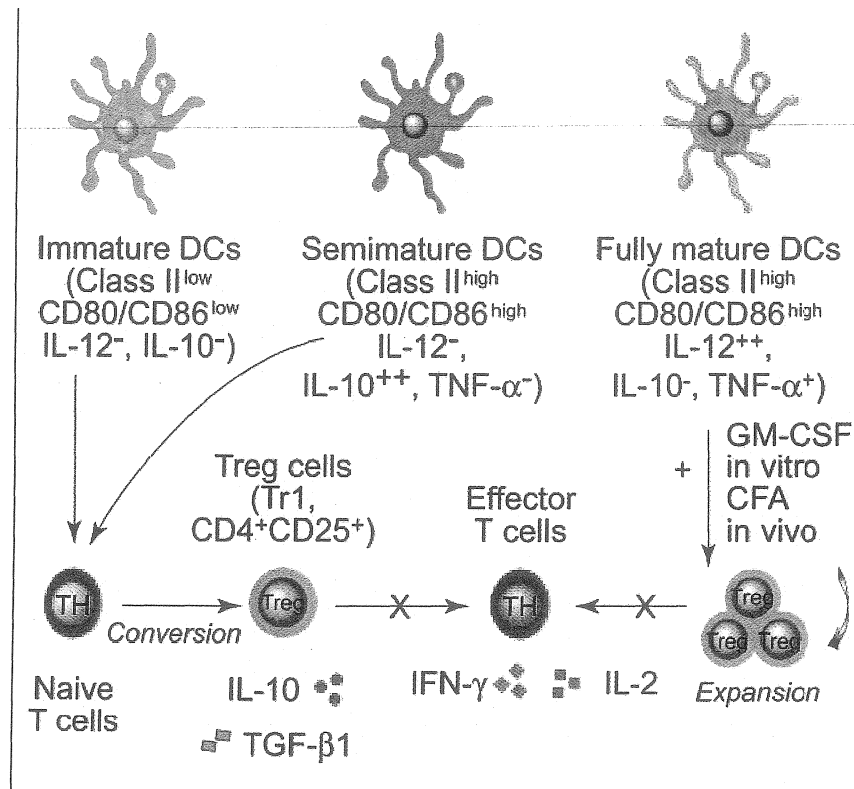


Figure 3. Mécanismes d'action des différents types de DCs tolérogènes. Il existe trois types de DCs tolérogènes capables d'activer ou d'induire la formation de lymphocytes T régulateurs. Les DC immatures et semi-matures favorisent la différenciation de lymphocytes T naïfs en lymphocytes T régulateurs alors que les DCs matures favorisent la prolifération des lymphocytes T régulateurs déjà existants. Les lymphocytes T régulateurs obtenus dans les deux situations possèdent les mêmes caractéristiques, soit une production de cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et TGF- $\beta$ ) ainsi qu'une activité inhibitrice de la prolifération des lymphocytes T effecteurs. Extrait de (Rutella et coll., 2006).

Plusieurs cytokines peuvent influencer le développement des DCs tolérogènes. L'IL-10 permet la génération de DCs tolérogènes exprimant faiblement CD11c et fortement CD45RB (CD11c<sup>low</sup>, CD45Rb<sup>hi</sup>) (Wakkach et coll., 2003). Pour ce faire, les auteurs ont cultivé des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse en présence d'IL-10. Les DCs ainsi obtenues ne montrent pas d'augmentation d'expression des molécules de co-stimulation suite à la maturation induite par le LPS et produisent des quantités importantes d'IL-10. Lorsque ces cellules sont pulsées avec un peptide dérivé de l'ovalbumine, elles permettent la différenciation de lymphocytes Tregs à partir de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs (Wakkach et coll., 2003). De plus, le groupe de Girolomoni a montré que l'IL-10 peut avoir un effet autocrine sur les DCs qui la produisent, en limitant leur processus de maturation (Corinti et coll., 2001). Cette étude a montré que les DCs matures ont une accumulation de l'ARN messager du récepteur de l'IL-10 ainsi qu'une accumulation intra-cellulaire de ce récepteur. Le contrôle de l'expression de ce récepteur serait, selon les auteurs, une façon clé de manipuler les fonctions biologiques des DCs (Corinti et coll., 2001).

Une autre cytokine influençant les fonctions tolérogéniques des DCs est la TSLP (thymic stromal lymphopoietin). La TSLP est produite par les cellules épithéliales du thymus des corpuscules de Hassall (Watanabe et coll., 2005). Les DCs traitées au TSLP expriment fortement le CMH II et les molécules de co-stimulation comparativement aux cellules contrôles, sécrètent une quantité négligeable d'IL-12p70 et promouvoient la

différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs en lymphocytes T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> régulateurs (Watanabe et coll., 2005).

Récemment, des études ont montré que le VIP (vasoactive intestinal peptide) a la capacité d'induire des DCs tolérogènes. Le VIP est un neuro-peptide relâché par les cellules immunitaires en réponse à un antigène et possède des caractéristiques d'un agent anti-inflammatoire (Chorny et coll., 2005). Des BMDC exposées à ce peptide se différencient en DCs qui résistent à la maturation et qui produisent des quantités importantes d'IL-10 (Chorny et coll., 2005). Ces DCs expriment fortement la molécule CMH de classe II mais expriment faiblement les molécules de co-stimulation (Chorny et coll., 2005).

Nous avons démontré au laboratoire que l'injection de GM-CSF à des souris NOD les protègent contre le développement du diabète de type 1 (Gaudreau et coll. données non publiées). Des analyses ultérieures ont permis de déterminer que l'injection de GM-CSF permet la génération d'une population de DCs tolérogènes semi-matures. Ces cellules expriment les molécules de co-stimulation et le CMH de classe II de façon similaire aux cellules de souris contrôles. Cependant, lorsque la maturation de ces cellules est induite par le LPS, une très faible augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation est observée. Ces DCs résistent à la maturation et demeurent dans un état semi-mature. Ces DCs produisent des quantités importantes d'IL-10, une cytokine connue pour avoir un effet inhibiteur sur la prolifération des lymphocytes T. *In vivo*, des transferts adoptifs ont permis de déterminer que ces DCs sont essentielles pour la

protection contre la pathologie du diabète de type 1. De plus, les souris traitées au GM-CSF montrent une augmentation du nombre de lymphocytes T régulateurs comparativement aux souris contrôles. L'augmentation de ces lymphocytes T régulateurs serait due à la présence de cette sous-population de DCs semi-matures.

La génération de DCs tolérogènes semble être une avenue très intéressante pour la protection contre le diabète de type 1. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la génération de DCs sont partiellement définis alors que ceux impliqués dans la génération de DCs tolérogènes ne le sont pas. Les prochaines sections présentent les connaissances actuelles des mécanismes moléculaires impliqués dans la génération des DCs.

## 2.8 Mécanismes moléculaires impliqués dans la génération des DCs

### 2.8.1 Implication de p38

Les MAP kinases sont impliquées dans le développement et la maturation des DCs. Certaines MAP kinases favorisent la différenciation des monocytes en DCs tandis que d'autres MAP kinases inhibent cette différenciation.

La protéine p38, comme son nom l'indique, est une protéine de 38 kDa qui fait partie de la famille des MAP kinases. Cette protéine semble jouer un rôle important lors de la maturation des cellules dendritiques. Chez ces dernières, la protéine p38 peut être activée par plusieurs stimuli pro-inflammatoires comme lors de liaison du CD40 à son ligand, d'une exposition au LPS ou au TNF- $\alpha$  (Arrighi et coll., 2001; Mathur et coll.,

2004). L'activation de p38 est requise pour la maturation des DCs (Arrighi et coll., 2001; Puig-Kroger et coll., 2001; Yu et coll., 2004), leur migration (Luft et coll., 2004) ainsi que pour la production d'IL-12 (Luft et coll., 2004; Mathur et coll., 2004; Puig-Kroger et coll., 2001). Plusieurs inhibiteurs pharmacologiques de p38 existent dont le SB 203580. Cet inhibiteur se lie au site catalytique de p38 et bloque son activité kinase. Chez les DCs, lorsque l'activité kinase de p38 est inhibée, leur maturation est fortement diminuée (Luft et coll., 2004). L'activation de p38 est importante pour la maturation des DCs, cependant, son activation nuit à la différenciation des monocytes en cellules dendritiques immatures (Xie et coll., 2003). L'inhibition de p38 favorise la différenciation des monocytes en cellules dendritiques immatures (Xie et coll., 2003).

Le groupe de Chang a voulu déterminer l'effet des MAP kinases sur CIITA (Yao et coll., 2006). Dans les BMDC (cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse), il a été démontré que la maturation induite par le LPS inhibait l'expression du gène CIITA. CIITA est un régulateur majeur de l'expression du CMH de classe II. Lors de la maturation des DCs, il n'y a pas de synthèse *de novo* des molécules de CMH mais bien export au niveau de la membrane plasmique des molécules déjà existantes et conservées dans des vésicules intra-cellulaires. Les auteurs de cette étude montrent que l'inhibition de p38 permet de restorer l'activation de CIITA inhibée par la maturation induite au LPS. Donc une fois de plus, l'activation de p38 favoriserait la maturation des DCs.

Il a aussi été rapporté que des souris déficientes en MKK3, une des kinases responsables de la phosphorylation et donc de l'activation de p38, avaient des cellules



dendritiques avec une production d'IL-12 compromise (Lu et coll., 1999). La maturation des DCs est un phénomène indépendant de la capacité de production de cytokines au niveau moléculaire, cependant, p38 intervient dans les deux phénomènes.

### 2.8.2 Implication de ERK

ERK (extracellular signal-regulated kinase) est une famille de protéines qui comprend plusieurs membres. ERK 1 et 2 sont activés en réponse à des facteurs de croissance et des agents mitogéniques comme l'ester de phorbol (Roux et Blenis, 2004). ERK 1 et 2 ont 83% d'homologie et sont exprimées dans la majorité des tissus et sont impliquées dans la survie et la prolifération cellulaire. Chez les DCs, le LPS permet l'activation de ERK 1 et 2 ce qui promouvoit leur survie (Rescigno et coll., 1998). Une étude a montré qu'une activation prédominante de ERK 1 et 2 comparativement à celle de p38 favorise la production d'IL-10 (Mathur et coll., 2004). L'IL-10 permet ensuite l'inhibition de la maturation des cellules dendritiques, l'augmentation de l'expression de CCR7 (Ato et coll., 2002) ainsi que l'inhibition de la production d'IL-12 (Loscher et coll., 2005). Lorsque ERK 1 et 2 sont inhibées chez les cellules dendritiques, il y a augmentation de leur maturation (Puig-Kroger et coll., 2001) ainsi que de leur migration (Luft et coll., 2004). Bien que l'inhibition de ERK 1 et 2 permet la maturation des DCs, une autre étude a rapporté que l'activation de ERK1 et 2 est requise pour la différenciation des monocytes humains en cellules dendritiques immatures (Xie et coll., 2003).

Les différentes MAP kinases ont plusieurs substrats, la majorité de ces substrats sont des facteurs de transcription. Selon le type de kinases activées, différents facteurs de transcription seront activés. Les facteurs de transcription, comme leur nom l'indique, permettent l'activation de la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la maturation et dans les fonctions des DCs. Des études ont investigué le rôle de quelques facteurs de transcription dans la génération des DCs. Cependant, le rôle de plusieurs facteurs dans la génération des DCs n'a pas encore été investigué.

### 2.8.3 Implication de NF- $\kappa$ B

Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B consiste en un homo- ou hétérodimère composé de protéines de la famille NF- $\kappa$ B: p50, p52, RelA (p65), RelB et c-Rel. (Xiao et coll., 2006). Les protéines p50 et p52 sont générées à partir de précurseurs, p105 et p100 respectivement. Lors de leur activation, il y a un clivage de la partie C-terminale des précurseurs. Le clivage de p105 en p50 est constitutif alors que le clivage de p100 en p52 est inductible (Xiao et coll., 2001). Deux voies d'activation permettent la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B, soit la voie classique (canonique) et la voie alternative (non-canonique) (Xiao et coll., 2006).

La voie classique de NF- $\kappa$ B (figure 4 à gauche) est activée rapidement suite à une stimulation par plusieurs stimuli pro-inflammatoires (Pahl, 1999). Cette voie nécessite l'activation du complexe multimérique de kinases IKK (I $\kappa$ B kinases) formé de IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  et IKK $\gamma$  aussi appelé NEMO (DiDonato et coll., 1997; Mercurio et coll., 1997;

Regnier et coll., 1997). Ces kinases phosphorylent I $\kappa$ B, une protéine qui séquestre le complexe NF- $\kappa$ B au cytoplasme. Une fois phosphorylée, I $\kappa$ B est poly-ubiquitinylée puis dégradée par le protéasome 26S. La dégradation de I $\kappa$ B libère le complexe NF- $\kappa$ B qui peut alors transloquer au noyau et permettre la transcription des gènes.

Quant à elle, la voie alternative de NF- $\kappa$ B (figure 4 à droite) est activée plus tardivement que la voie classique par des stimuli pro-inflammatoires. Cette voie nécessite l'activation de la kinase NIK qui permet l'activation et le recrutement de IKK $\alpha$  (Senftleben et coll., 2001). Le complexe formé de NIK et de IKK $\alpha$  se lie ensuite au précurseur inactif p100 et le phosphoryle dans les parties C- et en N-terminales (Xiao et coll., 2004). p100 est ensuite ubiquitinylée et clivée en sa forme active p52 (Fong et Sun, 2002; Xiao et coll., 2001). Par la suite, il y aura translocation au noyau pour permettre la transcription de gènes. Cette voie d'activation est responsable de la majorité de la translocation nucléaire de RelB (Solan et coll., 2002).

L'activation de NF- $\kappa$ B est cruciale pour la maturation des cellules dendritiques ainsi que pour leur activation (Rescigno et coll., 1998). Il a été démontré que les souris déficientes en NF- $\kappa$ B n'ont pas de cellules dendritiques myéloïdes (Weih et coll., 1995; Wu et coll., 1996). Une surexpression de I $\kappa$ B dans les DCs matures diminue l'expression des molécules de CMH de classe II, des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 et la production de TNF- $\alpha$  chez ces cellules (Yoshimura et coll., 2001). Chez la souris NOD, il a été démontré que les DCs ont un niveau d'activation de NF- $\kappa$ B élevé, ce qui serait responsable de leur capacité de présentation d'antigènes élevée (Poligone et coll., 2002;

Weaver et coll., 2001). Cette activation anormale serait due à une activité très importante du complexe de kinases IKK (Rescigno et coll., 1998). Le groupe de Ma (Ma et coll., 2003) a tenté de rétablir un niveau physiologique d'activation de NF- $\kappa$ B dans les DCs de souris NOD. Pour ce faire, ils ont utilisé une approche d'oligo-transfection avec un oligonucléotide compétitif contenant la séquence reconnue par NF- $\kappa$ B. Cette transfection a pour effet d'inhiber la liaison du facteur NF- $\kappa$ B aux promoteurs endogènes et donc d'empêcher la transcription des gènes activés par NF- $\kappa$ B. Les cellules dendritiques transfectées avec l'oligonucléotide étaient moins aptes à présenter des antigènes que les DCs transfectées avec le vecteur vide et protègent contre le développement du diabète de type 1, lorsqu'injectées à des souris NOD.

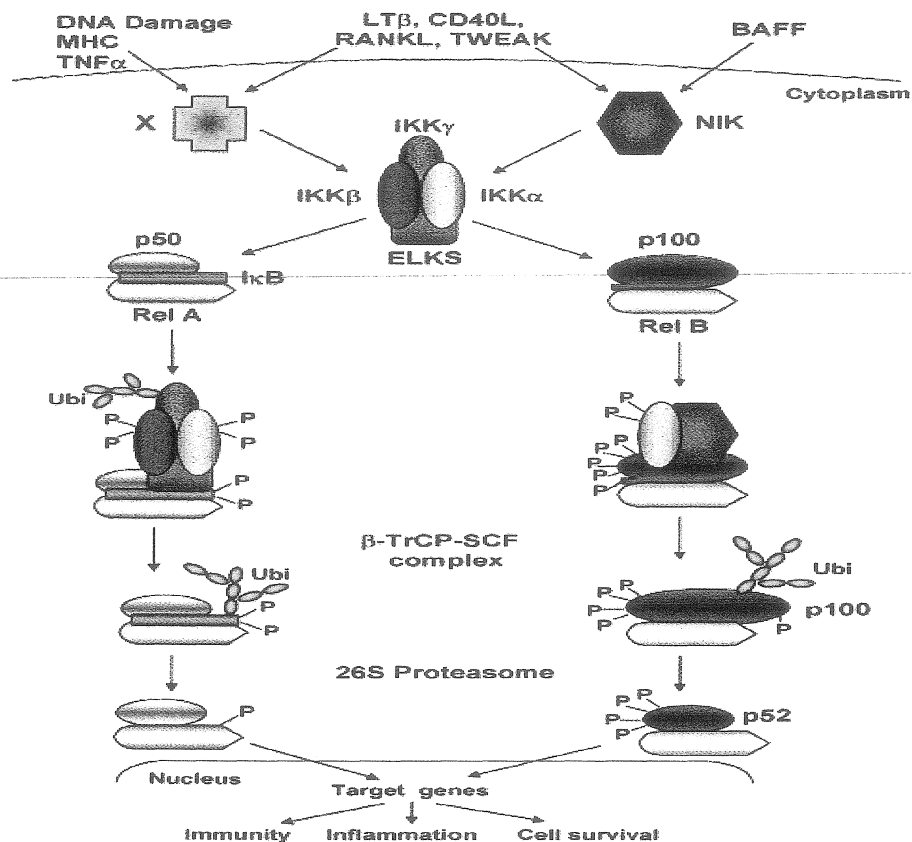


Figure 4. Représentation schématique des deux voies d'activation de NF-κB. La voie classique (représentée à droite sur la figure) représente l'activation rapide de NF-κB suite à un stimulus pro-inflammatoire. Cette voie requiert la dégradation de IκB qui permet la libération de NF-κB ainsi que sa translocation nucléaire. La voie alternative (représentée à gauche sur la figure) représente une activation plus tardive de NF-κB suite à un stimulus pro-inflammatoire. Cette voie requiert le clivage du précurseur inactif p100 en sa forme active p52, ce qui permet la translocation nucléaire du complexe NF-κB. Extrait de (Xiao et coll., 2006)

Le groupe de Ouaz a démontré qu'une mutation dans la protéine p50, p52, p65 (RelA) ou c-Rel n'affecte en rien le développement des DCs (Ouaz et coll., 2002). Par contre, les doubles mutations de p50 et RelA et de p50 et c-Rel affecte le développement des DCs. Cette étude suggère que les sous-unités p50, p52, p65 (RelA) et c-Rel auraient des rôles redondants au niveau des DCs et que la délétion d'une sous-unité peut être compensée par une autre sous-unité. Cependant, aucune sous-unité ne semble être capable de remplacer RelB puisque les souris déficientes en RelB possèdent moins de DCs au niveau de la rate et du thymus (Wu et coll., 1998). De plus, les DCs de ces souris ont une capacité de présentation d'antigènes et une immunité cellulaire moins efficaces que celles des souris contrôles (Wu et coll., 1998). Une étude a aussi montré que les DCs déficientes en RelB promouvoient la génération de lymphocytes T régulateurs lorsque pulsées avec un antigène (Martin et coll., 2003). La protéine RelB permet la différenciation de DCs, lorsqu'elle est inhibée, les monocytes ne peuvent se différencier en DCs. Cependant la génération et la différenciation des autres types cellulaires d'origine myéloïde n'est pas affectée par la délétion de RelB (Platzer et coll., 2004).

#### 2.8.4 Implication de CREB

La famille du facteur de transcription CREB, comprend le facteur ATF1 (activating transcription factor), le facteur CREM (cyclic AMP response element (CRE) modulator) ainsi que le facteur de transcription CREB (CRE binding protein) (Mayr et Montminy, 2001). Les facteurs de transcription CREB et ATF1 sont exprimés de façon

ubiquiste alors que le facteur de transcription CREM est principalement exprimé dans les tissus neuroendocriniens (Mayr et Montminy, 2001). Les facteurs CREB et CREM peuvent subir plusieurs épissages alternatifs générant des isoformes ayant une activité inhibitrice ou activatrice au niveau de la transcription de gènes (Foulkes et Sassone-Corsi, 1992; Long et coll., 2001). Lors de l'activation d'un récepteur couplé aux petites protéines G hétérotrimériques, il peut y avoir une activation de l'adénylyl cyclase qui augmente les niveaux d'AMP cyclique dans le cytosol de la cellule (Mayr et Montminy, 2001). Cette accumulation d'AMP cyclique permet l'activation de la protéine kinase A (PKA). Lorsque la cellule n'est pas activée, la PKA est restreinte au cytosol sous forme d'hétérotétramère inactif composé de deux sous-unités régulatrices et de deux sous-unités catalytiques. L'augmentation de l'AMP cyclique permet la libération des sous-unités catalytiques qui migrent passivement au noyau pour induire l'activation de la transcription de gènes via la phosphorylation de CREB (Gonzalez et Montminy, 1989). CREB médie la transcription de gènes en se dimérisant puis en se liant sur une séquence conservée TGACGTCA appelé CRE (cAMP-responsive element) (Comb et coll., 1986; Montminy et coll., 1986; Short et coll., 1986). La phosphorylation de CREB sur la sérine 133 permet le recrutement du co-activateur transcriptionnel CBP ou p300 (Arias et coll., 1994; Chrivia et coll., 1993). Des souris ayant une délétion du domaine «basic-leucine zipper» (bZIP) de CREB, responsable de la dimérisation du facteur de transcription et de la liaison à l'ADN, ont été générées. L'étude de ces souris a révélé qu'elles décédaient à la naissance d'une insuffisance respiratoire (Rudolph et coll., 1998). Ces souris ont aussi une déficience dans le développement des lymphocytes T exprimant un TCR de type  $\alpha\beta$  au niveau du thymus (Rudolph et coll., 1998).

### 2.8.5 Implication de C/EBP

Le facteur de transcription C/EBP a été caractérisé pour la première fois dans le laboratoire du Dr. McKnight en tant qu'une protéine résistante à la chaleur retrouvée dans le noyau des hépatocytes de rat (Johnson et coll., 1987). Le clonage du gène codant pour C/EBP (Landschulz et coll., 1988) et des études ultérieures ont permis de déterminer l'existence d'un domaine «basic-leucine zipper» (bZIP) permettant la liaison à l'ADN ainsi que la dimérisation. Par la suite, d'autres gènes codant pour d'autres protéines de la famille de C/EBP ont été découverts. Actuellement, on dénombre 6 membres de la famille C/EBP ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ , et  $\zeta$ ) qui sont codés par des gènes différents (Ramji et Foka, 2002). Des isoformes de certains membres de la famille C/EBP ont également été rapportés (Ramji et Foka, 2002) Par exemple, un usage alternatif des codons d'initiation de la traduction sur la même molécule d'ARN messager de C/EBP $\beta$ , et de C/EBP $\alpha$  permet de synthétiser des isoformes aux fonctions différentes. C/EBP $\epsilon$  possède plusieurs promoteurs et l'usage alternatif de ces différents promoteurs permet la synthèse de différentes molécules (Lekstrom-Himes, 2001; Yamanaka et coll., 1997). Dans le cas de C/EBP $\beta$ , trois isoformes sont connues : LAP\*, une protéine de 38 kDa, LAP, une protéine de 35 kDa et LIP, une protéine de 20 kDa (Descombes et Schibler, 1991). LAP et LIP sont généralement les deux formes les plus exprimées. LAP comprend le domaine d'activation ainsi que le domaine bZIP tandis que LIP ne comprend que le domaine de bZIP. L'absence du domaine d'activation confère à LIP un effet inhibiteur des C/EBP (Williamson et coll., 1998). Chaque C/EBP possède un domaine C-terminal très conservé (environ 90 % d'homologie) qui comprend un domaine riche en acides aminés basiques



constituant le domaine de liaison à l'ADN suivi d'un domaine de dimérisation appelé «leucine zipper» (Ramji et Foka, 2002). Les C/EBP peuvent hétérodimériser avec d'autres facteurs de transcription qui possèdent aussi un domaine bZIP (Hsu et coll., 1994; LeClair et coll., 1992; Vallejo et coll., 1993). La partie N-terminale des C/EBP est plus variable (moins de 20% d'homologie) sauf pour trois petites régions qui sont conservées entre les six isoformes (Angerer et coll., 1999; Cooper et coll., 1995; Nerlov et Ziff, 1994; Tang et Koeffler, 2001; Williams et coll., 1995; Williamson et coll., 1998). Ces trois régions représentent le domaine d'activation qui interagit avec les composantes de la machinerie cellulaire responsable de la transcription et permettant ainsi l'induction de la transcription de gènes (Angerer et coll., 1999; Cooper et coll., 1995; Nerlov et Ziff, 1994; Tang et Koeffler, 2001; Williams et coll., 1995; Williamson et coll., 1998). L'implication des C/EBP dans la génération des DCs n'est pas connue, cependant, il a été démontré que C/EBP $\beta$  est impliqué dans la différenciation et dans l'activation des macrophages (Poli, 1998; Screpanti et coll., 1995; Tanaka et coll., 1995). D'autres études ont rapportées que les macrophages de la rate de souris déficientes en C/EBP $\beta$  ont une production d'oxide nitrique et d'IL-12 réduite et, par conséquent, une faible induction d'une réponse immunitaire de type Th1 (Poli, 1998; Screpanti et coll., 1995; Tanaka et coll., 1995).

## 2.8.6 Implication d'AP-1

Le complexe dimérique AP-1 (activating protein-1) est un facteur de transcription qui régule l'expression de plusieurs gènes. Ce complexe est constitué des protéines de la famille Jun (c-Jun, JunB et JunD), des protéines de la famille Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 et Fra-2) ainsi que de quelques membres de la famille ATF (ATFa, ATF-2 et ATF-3) et de la famille JDP (JDP-1 et JDP-2) (Hess et coll., 2004). Toutes ces protéines possèdent un domaine «leucine-zipper» qui permet leur dimérisation, et qui est essentiel à leur translocation nucléaire. Les protéines de la famille Jun peuvent former des hétéro- et des homodimères, tandis que les protéines de la famille Fos ne peuvent pas former d'homodimères. Ces protéines doivent s'hétérodimériser avec des membres de la famille Jun (Hess et coll., 2004). c-Jun, c-Fos et FosB sont de puissants activateurs de la transcription tandis que JunB, JunD, Fra-1 et Fra-2 sont des activateurs faibles de la transcription voire des inhibiteurs d'AP-1 en compétitionnant pour les sites de liaison (Hess et coll., 2004). Le facteur de transcription AP-1 peut être activé par plusieurs stimuli comme des cytokines, des facteurs de croissance, des signaux de stress, des infections ainsi que des stimuli oncogéniques (Whitmarsh et Davis, 1996). Les membres de la famille Jun peuvent être activés par la MAP kinase JNK. L'activation des membres de la famille Fos n'est pas bien définie. Plusieurs protéines susceptibles d'activer les protéines Fos ont été identifiées, il s'agit des protéines FRK (Fos-related kinase) (Deng et Karin, 1994), RSK (ribosomal S6 kinase) et ERK (Chen et coll., 1996). Il a été démontré que la prolifération des lymphocytes T ainsi que leur production de cytokine est augmentée en absence de JunD (Meixner et coll., 2004). JunD et JunB sont aussi responsables de la différenciation et des fonctions des lymphocytes T auxiliaires. JunB

permet l'activation de la transcription du gène de l'IL-4 chez les lymphocytes T, ce qui permet une polarisation de type Th2 tandis que JunD inhibe la transcription du gène de l'IL-4 (Hartenstein et coll., 2002; Meixner et coll., 2004). L'importance fonctionnelle d'AP-1 chez les DCs n'est pas encore très bien définie. On sait toutefois qu'AP-1 est, en partie, responsable de la production d'IL-6 par les DCs (Saccani et coll., 2001).

### 3 Rationnelle

Les DCs tolérogènes générées *in vivo*, chez les souris NOD traitées au GM-CSF, ont un phénotype et des fonctions différentes comparativement aux DCs isolées de souris témoins. Ces DCs résistent à la maturation et produisent des quantités importantes de cytokines anti-inflammatoires. Même si plusieurs mécanismes moléculaires impliqués dans la maturation des DCs sont décrits dans la littérature, aucun mécanisme moléculaire permettant aux DCs tolérogènes de résister à la maturation n'a été identifié.

#### 3.1 Objectifs de recherches

- Générer *in vitro* des DCs tolérogènes chez deux types de souris, soit les souris NOD et les souris Balb/C, et caractériser les fonctions ainsi que le phénotype de ces cellules.
- Étudier les différents mécanismes moléculaires impliqués dans la génération des DCs tolérogènes.

## 4 Matériel et méthodes

### 4.1 Souris

Les souris mâles NOD et Balb/c (Taconic) et les souris 8.3-NOD (provenant du Dr. Santamaria, Université de Calgary, Calgary, Canada) sont maintenues dans un environnement sans pathogène à l'animalerie à la faculté de médecine de l'Université de Sherbrooke selon les normes du Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA).

### 4.2 Génération des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (BMDCs)

Les BMDC sont générées à partir de souris NOD et Balb/C et cultivées dans du RPMI 1640 (Sigma) complémenté avec 50 U/ml de pénicilline/streptomycine, 2mM de L-Glutamine, 50 $\mu$ M 2-mercaptoethanol, et 10% de sérum foetal de bovin (FBS). Les BMDC sont cultivées à une densité de  $10 \times 10^6$  cells/10ml/pétri avec 5ng/ml de GM-CSF recombinant de souris (rmGM-CSF, Cedarlane), avec ou sans 4.5ng/ml interleukine-4 (IL-4, Cedarlane). Au troisième jour, 10 ml de milieu de culture frais contenant du rmGM-CSF avec ou sans IL-4 est ajouté à chaque pétri. Au cinquième jour de culture, la moitié du milieu est retiré et est remplacé avec du milieu frais contenant du rmGM-CSF avec ou sans IL-4. Au septième jour de culture, les DCs sont récupérées du pétri de culture initiale et sont ensuite stimulées avec du LPS 1 $\mu$ g/ml dans de nouveaux pétris de culture pour 48 heures.

### 4.3 Anticorps pour la cytométrie de flux

Les BMDC sont récoltées, lavées puis marquées avec des anticorps pour des acquisitions à l'aide du FACScalibur (Becton Dickinson) et analysées grâce au logiciel CellQuest Pro™ (BD Biosciences).

L'anticorps monoclonal contre la protéine CD11c (clone N418) marqué au FITC a été acheté chez eBiosciences. Un anticorps provenant de la chèvre marqué à la fluoresceine et dirigé contre les IgG de rat est utilisé comme deuxième anticorps (Pierce). Les anticorps monoclonaux couplés à la biotine: anti-CD86 (B7-1) (clone 16-10A1), anti-CD80 (B7-2) (clone GL1), anti-CD11c (clone HL3), ont été achetés chez BD Pharmingen, l'anticorps monoclonal anti-F4/80 (clone BM8) a été acheté de eBiosciences. Pour ce qui est de l'anticorps anti-CD40, ce dernier fut purifié du surnageant de l'hybridome FGK 4-5-5 et purifié sur une colonne contenant de la protéine G.

### 4.4 Essai d'activation des lymphocytes T

Les BMDC sont récoltées et irradiées à 2400Gy puis pulsées avec le peptide NRP-A7 (KYNKANAF), un peptide spécifiquement reconnu par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> de souris 8.3-NOD, ou Tum (KYQAVTTTL), un peptide contrôle, à différentes concentrations variant de 0,001 à 1 µg/ml. Les BMDC sont mises en culture dans une plaque 96 puits à fond rond à une densité de 5000 cellules par puit. Les lymphocytes T

CD8<sup>+</sup> sont purifiés à partir de la rate de souris transgéniques 8.3-NOD par un tri à l'aide de billes magnétiques (Miltenyi Biotec) en suivant les instructions du manufacturier, et sont ajoutés ( $2 \times 10^4$  cellules/ puit) aux cellules dendritiques puis incubés à 37°C. Après 48 heures, le surnageant est récupéré et conservé pour analyser les cytokines et remplacé par du milieu frais contenant 1  $\mu$ Ci thymidine tritiée. Après 16 heures de culture, l'incorporation de thymidine tritiée est mesurée grâce à un compteur de radiations  $\beta$ .

#### 4.5 Essai de phagocytose

Les BMDC sont pré-incubées à 37°C ou à 4°C pendant quinze minutes puis mises en contact avec 100 ng/ml de dextran-FITC (Molecular Probes) pour des temps variant de 0 à 180 minutes. La réaction est ensuite arrêtée en ajoutant du PBS froid. Les cellules sont récupérées et ensuite lavées trois fois avec du PBS froid et analysées par FACS. Les résultats présentés montrent l'intensité de fluorescence moyenne obtenue à 37°C moins l'intensité de fluorescence moyenne obtenue à 4°C.

#### 4.6 Immunobuvardage de type Western

Les BMDC sont lavées avec du PBS deux fois puis lysées dans un tampon contenant : 50 mM de Tris, 0.15M de NaCl, 1mM de DTT, 1% de Triton X-100, 1mM d'AEBSF, 1mM de PMSF, 10 mM de NaF, 2 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2 mM de Nappi, 10  $\mu$ g/ml de leupeptine/pepstatine A, 10  $\mu$ g/ml d'aprotinine. Les lysats cellulaires ainsi obtenus sont séparés sur un gel SDS-PAGE 10% et transférés sur une membrane de nitrocellulose (Hybond-ECL, Amersham Biosciences). Les membranes sont ensuite bloquées pendant

une heure à température ambiante avec du TBS-T contenant 5% de lait et hybridées toute la nuit avec un anticorps primaire contre les protéines pp38, pERK1/2, ou p38, ERK1/2 (Cell Signaling) dans une solution de TBS-T contenant 5% BSA. Les membranes sont ensuite hybridées avec un anticorps secondaire couplé à la peroxidase de raifort (HRP) et la liaison des anticorps a été révélé par chimioluminescence (GE Healthcare).

#### 4.7 Fractionnement cellulaire et extraction nucléaires

Les BMDC sont récupérées des pétris puis centrifugées à 500g pour 10 minutes à 4°C. Les culots cellulaires ont été resuspendus dans un tampon froid (10 mM de Tris-Base, pH 7,4, 10 mM de NaCl, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM de EGTA, 0.5 mM de EDTA, 0.5 mM de DTT) contenant 1 mM de PMSF, 1 mM de AEBSF, 10 µg/ml d'aprotinine, de leupeptine et de pepstatine A, 10 mM de NaF, 1 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM de Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. Les cellules sont incubées sur glace pendant 10 minutes puis un volume égal du même tampon est rajouté aux cellules mais contenant cette fois-ci 0.2% de NP-40. Les cellules sont vortexées immédiatement pendant 15 secondes et centrifugées à 1500g pendant 5 minutes, à 4°C. Le surnageant est récupéré et représente la fraction cytoplasmique des cellules. L'extraction nucléaire est effectuée en lavant le culot ainsi obtenu et en le resuspendant dans un tampon de lyse contenant 10% glycérol. Du NaCl a ensuite été rajouté pour obtenir une concentration finale de 400 mM. Suite à une incubation de 20 minutes sur glace avec agitation occasionnelle, les extraits nucléaires sont centrifugés à 13,000g pendant 15 minutes, à 4°C. Le surnageant contient les protéines nucléaires et celui-ci a immédiatement été congelé à -80°C.



#### 4.8 Gel de retardement (EMSA)

Les extraits nucléaires (normalement 2 à 5  $\mu\text{g}$ ) sont ajoutés à un tampon de liaison (20 mM de Tris-Base pH 7.50, 50 mM de KCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de DTT, 0.1% de NP40, 5% de glycerol, 6  $\mu\text{g}$  de BSA acétylé et 0.8  $\mu\text{g}$  de poly dI-dC) pour obtenir un volume final de 18  $\mu\text{l}$ . Ensuite, 10 fmoles (dans un volume finale de 2  $\mu\text{l}$ ) d'oligonucléotide marqué au  $^{32}\text{P}$  sont ajouté à la réaction (réaction de liaison) et incubé pendant 15 minutes à température ambiante. Pour les essais de compétition («super shift»), la réaction de liaison est effectuée en présence d'une sonde non-marquée ou en présence d'un anticorps spécifique, pour 20 minutes à 4°C. Par la suite, l'oligonucléotide marquée est ajoutée à la réaction. Les échantillons ainsi obtenus sont soumis à une électrophorèse sur un gel natif de 5.5% à 4°C dans du TBE 0.5X. Le gel est ensuite séché et exposé par autoradiographie à -70°C pendant environ 16 heures. Les séquences des oligonucléotides double-brin utilisés pour les EMSA sont pour AP-1 (5'CGCTTGATGAGTCAGCCGG-AA-3'), CREB (5'-AGAGATTGCCTTGACGTCAGAGAGCTAG-3') et C/EBP (5'-TGCAGATTGCGCAATCTGCA-3'). Ces oligonucléotides représentent les séquences consensus de liaison et provenaient pour AP-1 et CREB de Promega (Madison, WI) et pour C/EBP Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). L'oligonucléotide utilisée pour la détection de la liaison de NF- $\kappa$ B consistait aux sites NF- $\kappa$ B sur le HIV-1 LTR répétés en tandem 5'-GATCAGGGACTTTCCGCTGGGGACTTTCC-3'). Pour les «supershifts», les anticorps utilisés pour p50 (SC-7178X), p52 (SC-298X), p65 (SC-372X), RelB (SC-226X), c-Rel (SC-70X), C/EBP $\alpha$  (SC-61X), C/EBP $\beta$  (SC-150X), C/EBP $\delta$  (SC-151X),

C/EBP $\epsilon$  (SC-158X) et C/EBP $\gamma$  (SC-7658X) provenaient de chez Santa Cruz Biotechnology.

#### 4.9 Production de cytokines par les BMDCs

Les BMDC immatures sont récoltées à jour 7 et cultivées dans des plaques à 96 puits à une densité de  $1 \times 10^6$  cellules/ml et stimulées avec du LPS à une concentration de 1  $\mu$ g/ml pour 24 ou 48 heures. Les surnageants sont ensuite récoltés puis analysés par ELISA pour la production d'IL-10, d'IL-12p70, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-2 et d'IFN- $\gamma$  selon le protocole fourni par le manufacturier (R & D Systems). Brièvement, l'anticorps de capture adhère à la plaque (Nunc) pendant 16 heures à température ambiante. Par la suite, la plaque est lavée et bloquée avec une solution de sucrose 5% et de BSA 1%. Les échantillons à doser sont ensuite déposés dans les puits et incubés deux heures à température ambiante. Après un cycle de trois lavage, l'anticorps de détection couplé à la biotine est déposé dans les puits pour une durée de deux heures à température ambiante. Par la suite, la plaque est lavée à nouveau et la streptavidine-HRP est ajoutée pour une durée de 20 minutes. Après un autre cycle de lavage, le substrat (mélange 1:1 de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de Tétraméthylbenzidine) est ajouté et la réaction est arrêté par l'ajout d'acide phosphorique. La lecture de la plaque est effectuée à la longueur d'onde 450 nm et en soustrayant la lecture obtenue à 570 nm.

## 5 Résultats:

### 5.1 Expression des molécules de co-stimulation par les DCs avant et après induction de la maturation par le LPS

Nous avons commencé par étudier le phénotype des différents types de DCs générés *in vitro* en analysant l'expression des molécules de co-stimulation retrouvées à la surface des cellules. Pour ce faire, les DCs générées avec du GM-CSF (GM DCs) et les DCs générées avec du GM-CSF et de l'IL-4 (IL-4 DCs) ont été marquées avec divers anticorps spécifiques pour les molécules de co-stimulation. Les résultats obtenus (Figure 5) montrent que les GM DCs et les IL-4 DCs immatures de souris NOD ont un niveau d'expression similaire des molécules de co-stimulation soient B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), et de CD40. Suite à la maturation induite par le LPS, les IL-4 DCs des souris NOD montrent une augmentation plus importante de l'expression des molécules de co-stimulation que les GM DCs qui ne montrent pas une forte augmentation de l'expression de ces molécules. Les DCs immatures générées à partir de souris Balb/C ont un niveau d'expression similaire à celui retrouvé chez les DCs immatures de souris NOD. Suite à la maturation induite par le LPS, on observe que les IL-4 DCs de souris Balb/C ont une augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation qui est similaire à celle observée chez les IL-4 DCs de souris NOD. Comme chez la NOD, les GM DCs de souris Balb/C ne montrent pas une forte augmentation de l'expression des molécules B7.1 et B7.2 suite à l'induction de la maturation par le LPS. Les GM DCs de souris Balb/C montrent toutefois, une augmentation importante de l'expression de CD40 suite à la maturation induite par le LPS. Cette augmentation n'est pas observée chez les GM DCs

de souris NOD. Ces résultats montrent que les GM DCs des deux souches de souris semblent résister à la maturation puisque seulement une faible augmentation des molécules de co-stimulation est observée suite à la maturation induite par le LPS. Les IL-4 DCs des deux souches de souris possèdent un profil de maturation similaire et correspondant à un profil normal de maturation.

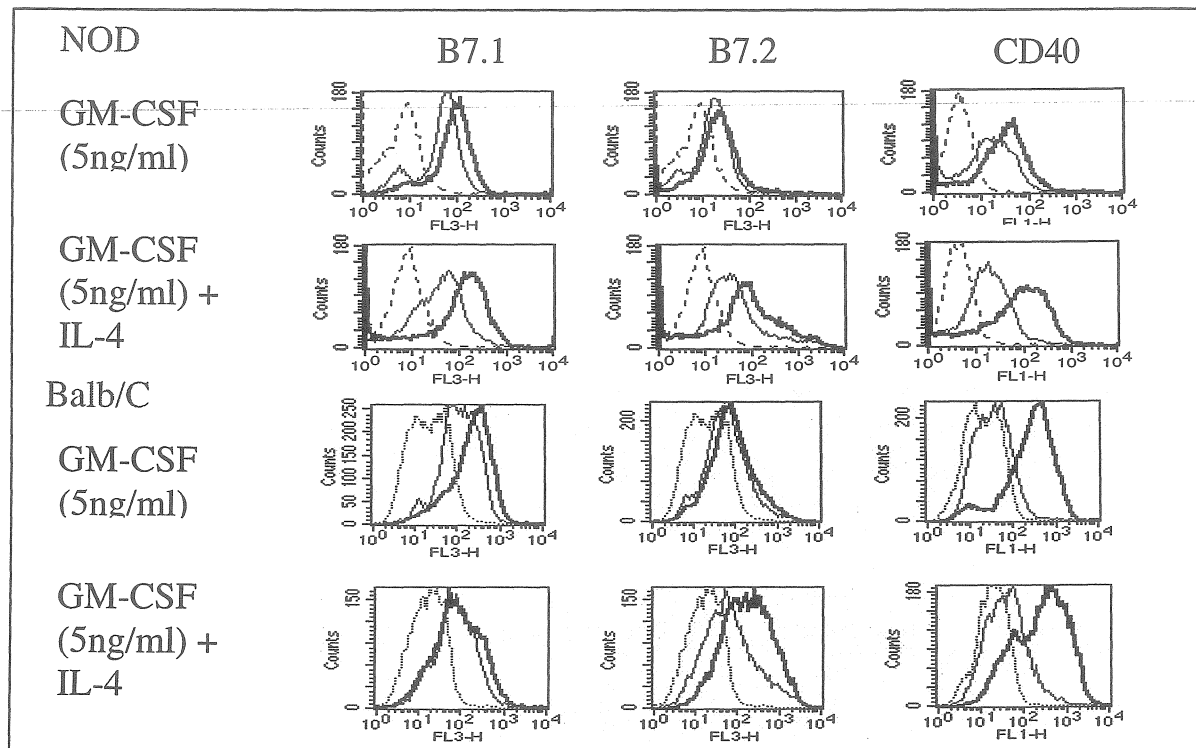


Figure 5. Analyse de l'expression des molécules de co-stimulation chez les différents types de DCs.

Les GM DCs et les IL-4 DCs de souris NOD et Balb/C obtenues avant et après l'induction de la maturation par le LPS ont été marquées par des anticorps fluorescents puis l'expression des molécules de co-stimulation a été analysée par cytométrie de flux. La ligne pointillée représente l'isotype contrôle, la ligne continue représente les DCs avant la maturation induite par le LPS, tandis que la ligne continue en gras représente les DCs suite à la maturation induite par le LPS.

## 5.2 Comparaison de la capacité d'activation des lymphocytes T par les différents types de DCs

Puisque les DCs tolérogènes ont une capacité réduite d'activation des lymphocytes T (Rutella et coll., 2006), nous avons testé la capacité des différents types de DCs à induire la prolifération des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> de façon antigène spécifique. Pour ce faire, les GM DCs et les IL-4 DCs avant ou après induction de la maturation par le LPS sont irradiées puis pulsées avec un peptide témoin, le Tum, ou le peptide NRP-A7. Ce peptide est spécifiquement reconnu par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> isolés de souris transgénique 8.3-NOD.

Tout d'abord, on remarque que les GM DCs de souris NOD (Figure 6 a), sont moins efficaces à présenter le peptide et à activer les lymphocytes T que les IL-4 DCs de souris NOD. Suite à l'induction de la maturation par le LPS, les GM DCs de souris NOD augmentent leur capacité à activer les lymphocytes T (Figure 6 a). Chez les souris NOD, les IL-4 DCs activent plus efficacement les lymphocytes T que les GM DCs (Figure 6 a). Les IL-4 DCs de souris NOD induisent la prolifération de façon plus efficace suite à la maturation par le LPS. Les GM DCs générées à partir de souris Balb/C ont aussi une très faible capacité à induire l'activation des lymphocytes T (Figure 6 b). Les IL-4 DCs immatures de souris Balb/C pulsées avec le peptide NRP-A7 sont significativement moins efficaces pour induire l'activation des lymphocytes T que les IL-4 DCs matures du même type de souris (Figure 6 b).

Par la suite, nous avons analysé les cytokines produites par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> durant cette activation. Pour ce faire, les surnageants ont été récoltés après 48 heures de co-culture puis les cytokines produites ont été quantifiées par ELISA. Les lymphocytes T activés par les DCs de souris NOD (figure 6 c) ou de souris Balb/C (figure 6 d) produisent des quantités d'IL-2 correspondant à leur intensité de prolifération. Une fois de plus, les IL-4 DCs de souris NOD (figure 6 c) et de souris Balb/C (figure 6 d) obtenues après l'induction de la maturation et pulsées avec le peptide NRP-A7, permettent une plus grande production IL-2 par les lymphocytes T. Les GM DCs de souris NOD et de souris Balb/C pulsées avec le peptide NRP-A7 n'induisent pas une production importante d'IL-2 par les lymphocytes T comparativement aux concentrations obtenues avec les IL-4 DCs. L'analyse de la production d'IFN- $\gamma$  montre aussi que les cellules dendritiques de souris NOD (figure 6 e) induisent une production d'IFN- $\gamma$  beaucoup plus importante que les DCs de souris Balb/C (figure 6 f). Les GM DCs et les IL-4 DCs de souris NOD induisent une plus grande production d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T suite à la maturation induite par LPS (figure 6 e).

En résumé, les IL-4 DCs matures des deux types de souris favorisent la prolifération des lymphocytes T spécifiques pour le peptide NRP-A7 ainsi que leur production d'IL-2. Les IL-4 DCs de souris NOD favorisent la production d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T contrairement aux IL-4 DCs matures de Balb/C (figure 6 e et f). De plus, les GM DCs des deux types de souris n'induisent pas une prolifération et une production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  aussi importantes que les IL-4 DCs matures des deux types de souris.

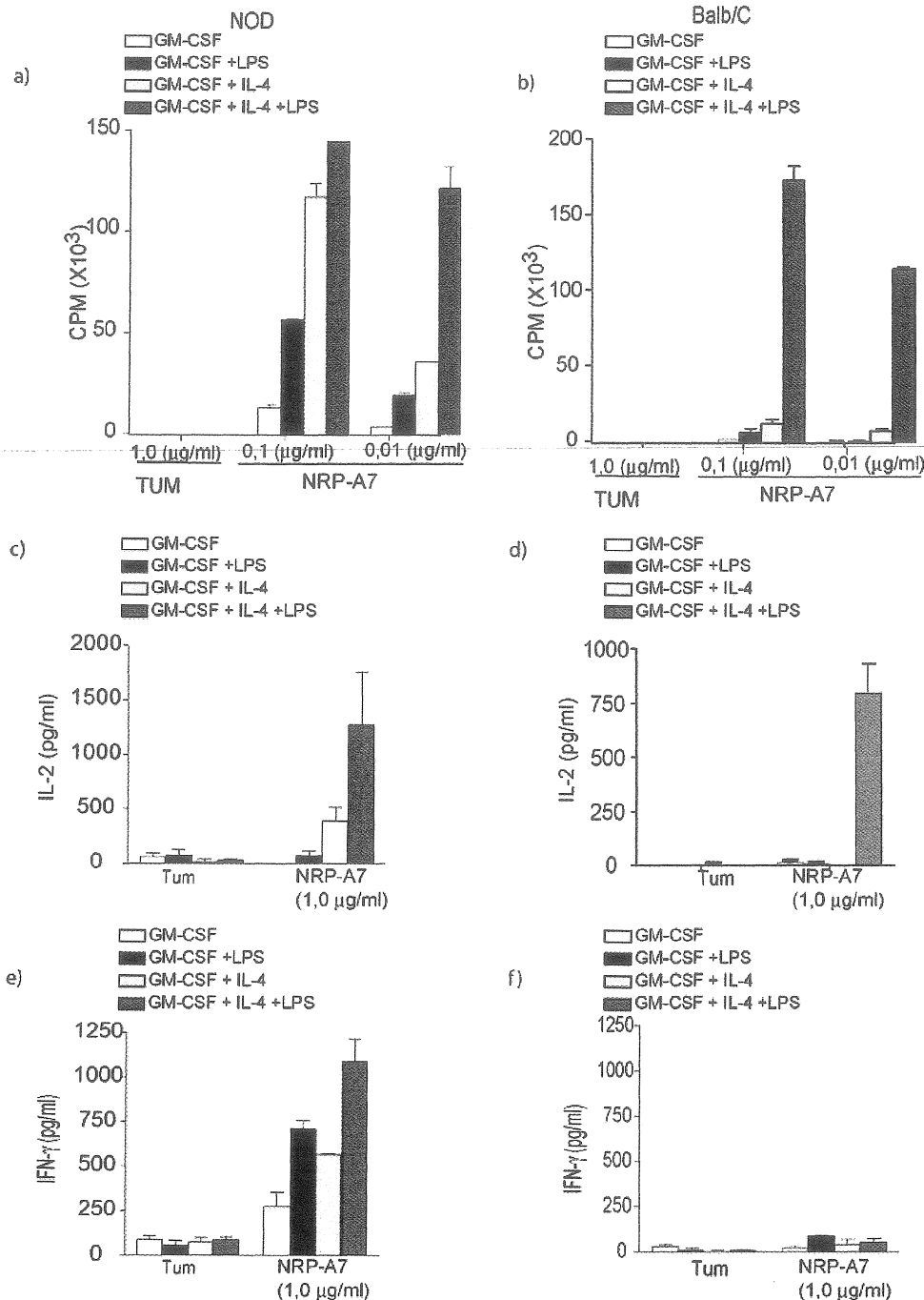


Figure 6. Analyse de la capacité d'activation des lymphocytes T par les différents types de DCs.

Les différents types de DCs des deux souches de souris a) NOD, b) Balb/C ont été récoltées avant et après la maturation induite au LPS puis leur capacité d'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> a été mesurée par incorporation de thymidine tritiée. Suite à cette co-culture, les cytokines produites par les lymphocytes T telles que l'IL-2 (c) NOD et d) Balb/C) et l'IFN-γ (e) NOD et f) Balb/C) produites par les lymphocytes T ont été mesurées par ELISA.



### 5.3 Capacité de phagocytose des différents types de DCs

Une fonction importante des DCs immatures est leur capacité à phagocyter des antigènes. Lorsque les DC deviennent matures, elles perdent cette capacité de phagocytose (Banchereau et coll., 2000). Nous avons donc investigué la capacité de phagocytose de billes de dextran-FITC par les GM DCs et les IL-4 DCs de souris NOD et Balb/C avant et après maturation induite par le LPS. La capacité de phagocytose (figure 7), est représentée en terme d'intensité de fluorescence moyenne (MFI) qui correspond à la MFI obtenue à 37°C moins celle obtenue à 4°C. La soustraction de la MFI obtenue à 4°C permet d'éliminer la fluorescence non-spécifique causée par l'adhésion des billes de dextran aux parois cellulaires.

Les GM DCs stimulées au LPS pendant 48 heures possèdent une plus grande capacité de phagocytose que les GM DCs immatures et ce pour les cellules provenant de souris NOD (Figure 7 a) et de souris Balb/C (Figure 7 b). Toutefois, les GM DCs activées au LPS provenant de souris Balb/C (Figure 7 b) montrent une plus grande capacité de phagocytose que les GM DCs activées au LPS générées à partir de la moelle osseuse de souris NOD (Figure 7 a). Les IL-4 DCs des deux types de souris possèdent une plus grande capacité de phagocytose avant l'induction de la maturation induite par le LPS que suite à celle-ci (NOD Figure 7 c et Balb/C figure 7 d). Ces résultats montrent que les GM DCs générées à partir de souris NOD et de souris Balb/C conservent la capacité de phagocyter suite à une stimulation au LPS, contrairement aux IL-4 DCs.

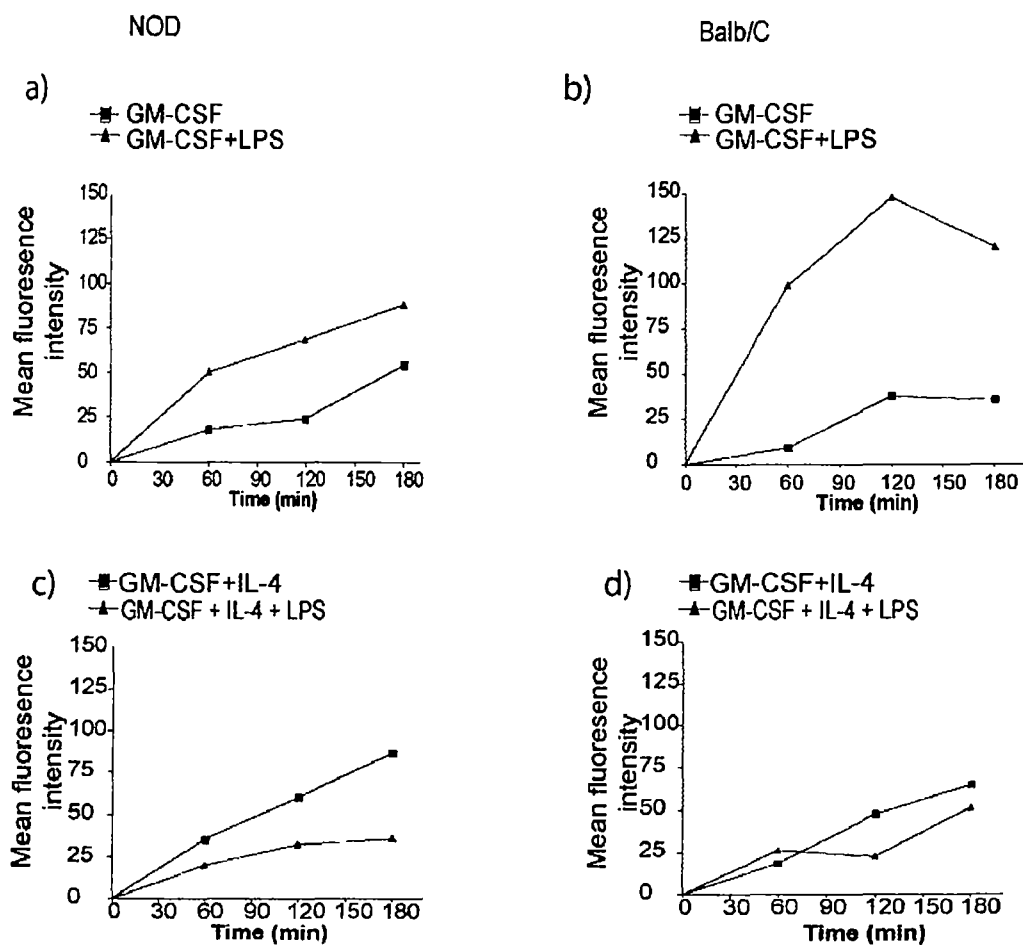


Figure 7. Analyse de la capacité de phagocytose des différents types de DCs. Les GM DCs et les IL-4 DCs des souris NOD et Balb/C ont été récoltées avant et après la maturation induite par le LPS et mises en présence de billes de dextran-FITC. La phagocytose de ces billes est analysée par cytométrie de flux.

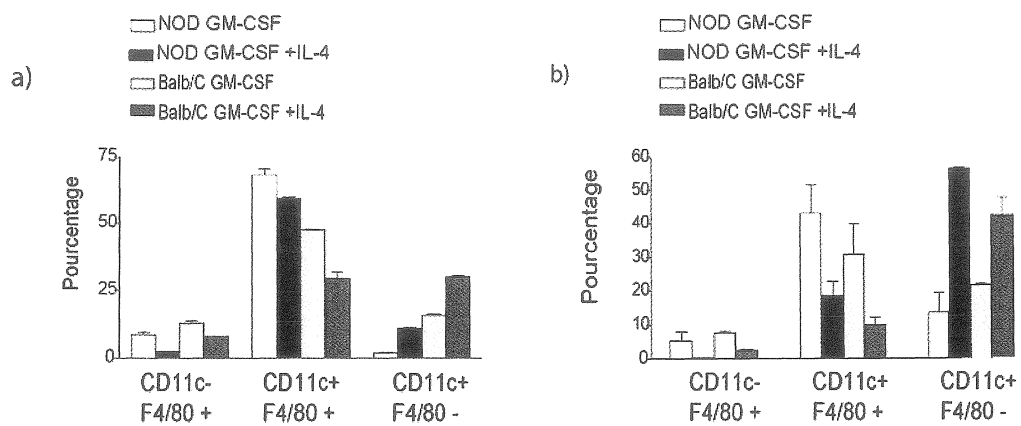
#### 5.4 Expression de F4/80 par les différents types de DCs

F4/80 est une molécule impliquée dans la tolérance. Une étude a montré que cette molécule est requise pour l'induction de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> régulateurs (Lin et coll., 2005). Les niveaux d'expression de F4/80 sont modulés lors de la maturation des DCs. Les DCs immatures expriment F4/80, alors que les DCs matures perdent l'expression de cette molécule. Nous avons investigué l'expression de F4/80 chez les différents types de DCs .

Avant la maturation induite par le LPS, les GM DCs et les IL-4 DCs de souris NOD possèdent une sous-population plus importante de cellules qui expriment F4/80 et CD11c (F4/80<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) que les GM DCs et les IL-4 DCs de souris Balb/C ( $p < 0.02$ ) (figure 8 a). Cependant, les cellules dendritiques de souris Balb/C possèdent une sous-population plus importante de cellules exprimant CD11c mais n'exprimant pas F4/80 (CD11c<sup>+</sup> F4/80<sup>-</sup>) que les DCs de souris NOD et ce aussi bien chez les GM DCs que les IL-4 DCs ( $p < 0.0018$ ) (figure 8 a). Des différences significatives sont aussi observées entre les GM DCs et les IL-4 DCs de souris NOD. Les GM DCs de souris NOD possèdent un pourcentage inférieur de cellules exprimant CD11c mais pas F4/80 (CD11c<sup>+</sup> F4/80<sup>-</sup>) que les IL-4 DCs des mêmes souris (figure 8 a).

Suite à la maturation induite par le LPS, des changements sont observés entre les GM DCs et les IL-4 DCs des deux types de souris. Les IL-4 DCs des deux souches de

souris possèdent une sous-population plus importante de cellules n'exprimant plus la molécule F4/80 que les GM DCs (CD11c<sup>+</sup> F4/80<sup>-</sup>) (figure 8 b). Cette différence est significative chez les NOD (p=0.0175) mais pas chez les Balb/C (p=0.0639). Les GM DCs des deux souches de souris conservent une sous-population importante de cellules l'exprimant encore F4/80 (CD11c<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup>) (figure 8 b) tandis que chez les IL-4 DCs cette sous-population diminue considérablement.



**Figure 8. Expression de F4/80 par les différents types de DCs**  
 Les GM DCs et les IL-4 DCs des souris NOD et des souris Balb/C ont été récoltées avant (a) et après maturation induite par le LPS (b) puis marquées avec des anticorps spécifiques contre les molécules F4/80 et CD11c.

## 5.5 Production de cytokines par les DCs

Dans cette étude, nous avons examiné le profil de cytokines produites par les différents types de DCs générées *in vitro*. Nos résultats montrent que les GM DCs de souris NOD et Balb/C sécrètent des concentrations élevées d'IL-10 (figure 9 a), alors que les IL-4 DCs de souris NOD ne sécrètent pas d'IL-10 (figure 9 a) suite à une stimulation au LPS de 24 ou 48 heures. Les IL-4 DCs de souris Balb/C sécrètent une concentration plus importante d'IL-10 comparativement aux IL-4 DCs provenant de souris NOD (figure 9 a). Il est à noter que les cellules non-stimulées ne produisent pas d'IL-10.

Pour ce qui est des cytokines proinflammatoires, les concentrations d'IL-12p70 et d'IFN- $\gamma$  produites par les différents types de DCs ont été analysées. Les IL-4 DCs de souris NOD et de souris Balb/C produisent des concentrations importantes d'IL-12p70 (figure 9 b), comparativement aux GM DCs (figure 9 b). Les GM DCs de souris NOD produisent des concentrations minimales d'IL-12 p70, alors que les GM DCs de souris Balb/C n'en produisent pas (figure 9 b). Des résultats similaires ont été obtenus pour ce qui est de la production d'IFN- $\gamma$  (figure 9 c). Les IL-4 DCs des deux types de souris produisent de l'IFN- $\gamma$  alors que les GM DCs des deux souches de souris n'en produisent pas (figure 9 c). Les IL-4 DCs de souris NOD produisent une concentration beaucoup plus importante d'IFN- $\gamma$  que les IL-4 DCs de souris Balb/C (figure 9 c)

Les surnageants ont aussi été analysés pour la production d'IL-6 (figure 9 d) et de TNF- $\alpha$  (figure 9 e). Pour ce qui est de l'IL-6, les IL-4 DCs et les GM DCs provenant de souris NOD produisent des concentrations similaires de cette cytokine (figure 9 d). Les IL-4 DCs et les GM DCs provenant de souris Balb/C produisent aussi des concentrations importantes d'IL-6 (figure 9 d), comparable à celles produites par les cellules de souris NOD. Des résultats similaires ont été obtenus pour ce qui est de la production de TNF- $\alpha$  (figure 9 e). Les IL-4 DCs et les GM DCs de souris NOD produisent des concentrations semblables de TNF- $\alpha$  (figure 9 e). Les mêmes observations sont aussi valables pour les cellules de souris Balb/C (figure 9 e). Il est important de noter que les cellules de souris NOD produisent plus de TNF- $\alpha$  que les cellules de souris Balb/C. On remarque aussi que les DCs non-stimulées produisent des concentrations appréciables de TNF- $\alpha$ .

Les GM DCs de souris NOD et de souris Balb/C produisent plusieurs cytokines soient l'IL-10, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$ . Les IL-4 DCs des deux souches de souris produisent, quant à elles, de l'IL-12p70, de l'IFN- $\gamma$ , de l'IL-6 ainsi que du TNF- $\alpha$ .

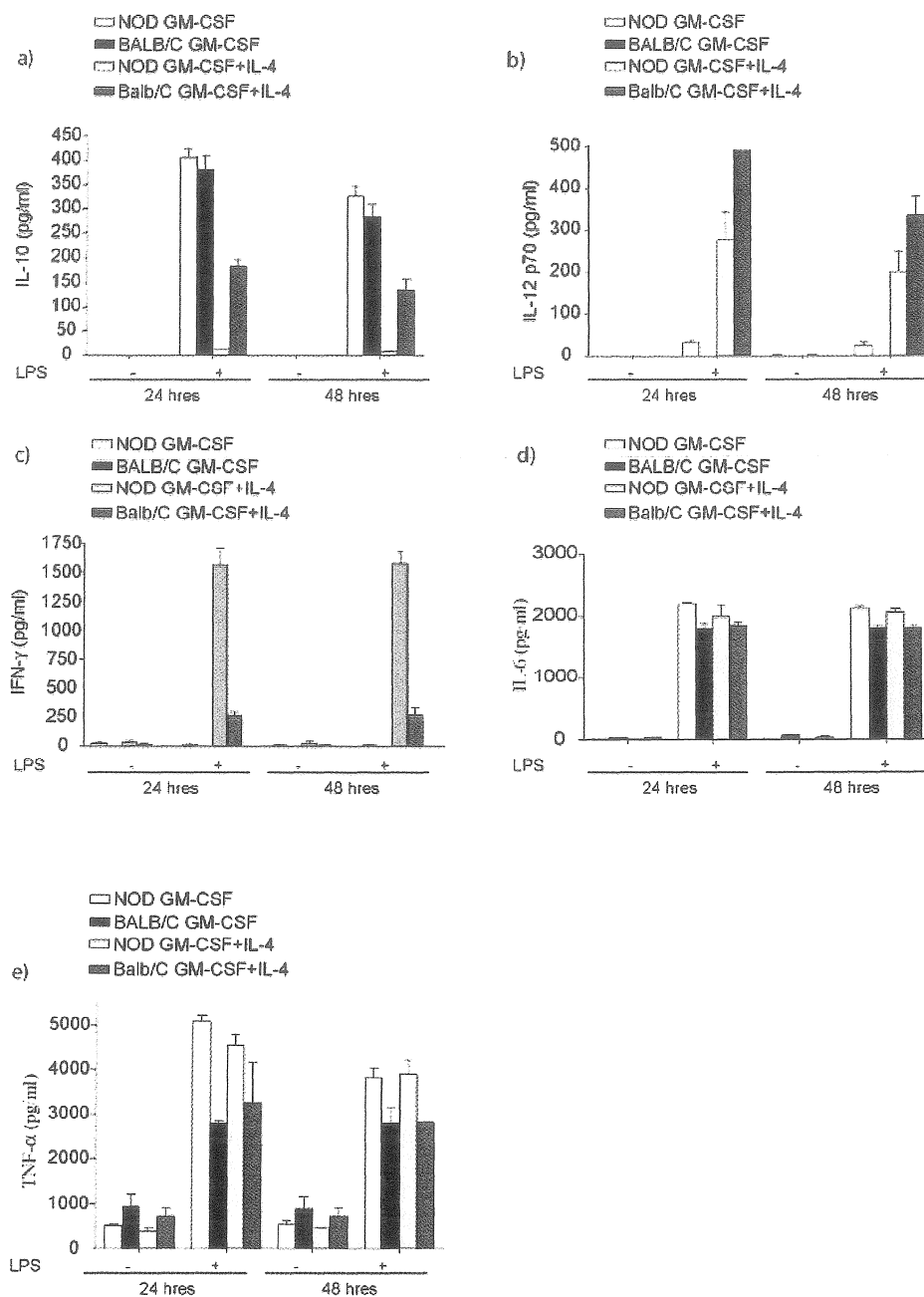


Figure 9. Sécrétion de cytokines pro et anti-inflammatoires par les différents types de DCs.

Les GM DCs et IL-4 DCs de souris NOD et Balb/C ont été récoltées au septième jour de culture puis stimulées au LPS pour 24 et 48 heures. Les concentrations de cytokines sécrétées par les différents types de DCs ont été déterminées par ELISA.



## 5.6 Activation des MAP kinases durant la génération des DCs toléroènes

Puisque les fonctionnalités, le phénotype ainsi que les cytokines produites par les différents types de DCs sont très différents, nous avons investigué les mécanismes moléculaires impliqués dans ces différents processus. Des extraits de protéines totales ont été effectués sur des GM DCs et de IL-4 DCs avant ou après maturation induite par le LPS des deux types de souris. Par la suite, nous avons analysé les niveaux d'activation des MAP kinases impliquées dans la maturation des DCs. Comme les GM DCs de souris NOD et de souris Balb/C produisent des concentrations importantes d'IL-10 suite à une stimulation au LPS et que des travaux antérieurs ont démontré que l'activation de ERK 1 et 2 pouvait être impliquée dans la production de cette cytokine (Mathur et coll., 2004), nous avons analysé le niveau de phosphorylation de ERK 1 et 2. Les GM DCs avant la maturation au LPS ont une activation basale importante de ERK 1 et 2 (figure 10). Suite à une stimulation au LPS pendant 48 heures, les GM DCs gardent une activation importante de ERK 1 et 2, et ce, chez les cellules provenant de souris NOD et Balb/C (figure 10). Les IL-4 DCs des deux souches de souris ont aussi une activation de ERK 1 et 2 importante avant la maturation induite par les LPS (figure 10). Cependant, suite à la maturation induite par le LPS, ces cellules perdent presque totalement l'activation de ERK 1 et 2 et ce chez les cellules provenant de souris NOD et de souris Balb/C (figure 10).

Par la suite, nous avons analysé les niveaux d'activation de p38, cette MAP kinase est essentielle à la maturation de DCs et à la production de certaines cytokines comme l'IL-12p70 (Arrighi et coll., 2001; Luft et coll., 2004; Puig-Kroger et coll., 2001;

Yu et coll., 2004). Les GM DCs de souris NOD et de souris Balb/C montrent une activation (phosphorylation) élevée de p38 avant la maturation induite par le LPS (figure 10). Suite à la maturation induite par le LPS des GM DCs de souris NOD, cette phosphorylation est fortement diminuée alors qu'elle est soutenue et même augmentée chez les cellules de souris Balb/C (figure 10). Pour ce qui est des IL-4 DCs, il n'y a pas de phosphorylation apparente de p38 chez les souris NOD et ce, avant et après maturation induite par le LPS (figure 10). Par contre, les IL-4 DCs de souris Balb/C possèdent une faible phosphorylation basale de p38 qui diminue suite à la maturation induite par le LPS (figure 10).

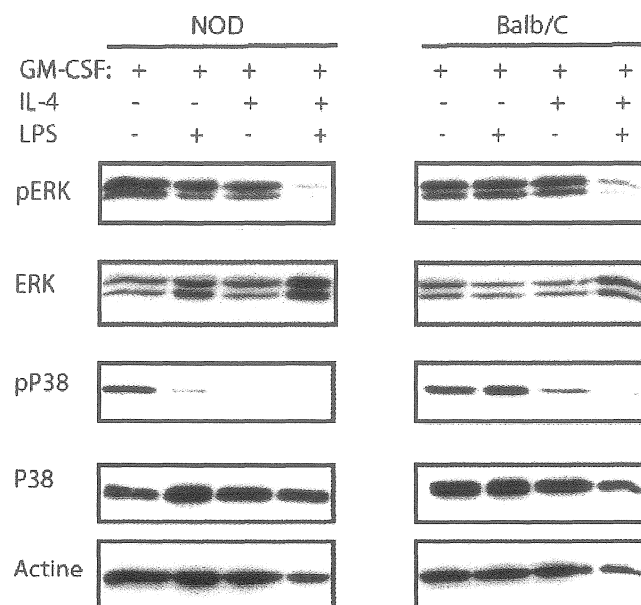


Figure 10. Analyse de l'activation des MAP kinases ERK1 et 2 et p38 chez les différents types de DCs.

Les DCs de souris NOD et de souris Balb/C ont été récoltées avant et après maturation induite par le LPS puis des extractions de protéines ont été effectuées. Ces extraits ont été soumis à une immunobuvardage de type Western avec des anticorps spécifiques dirigés contre les protéines ERK 1 et 2 et p38.

## 5.7 Activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B durant la génération des DCs tolérrogènes

Plusieurs facteurs de transcription sont impliqués dans la différenciation ainsi que dans la maturation des DCs (Cejas et coll., 2005). Nous avons tenté de déterminer quels facteurs de transcription pouvaient être responsables du phénotype ainsi que des fonctions des DCs tolérrogènes. Nous avons débuté par l'analyse de l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, impliqué dans la maturation des DCs. Des extractions de protéines nucléaires ont été effectuées sur des GM DCs et les IL-4 DCs activées ou non au LPS chez les deux souches de souris.

Des gels de retardement ont été effectués afin d'analyser les niveaux d'activation de NF- $\kappa$ B. La première analyse de ces résultats montre que les GM DCs et les IL-4 DCs de souris NOD et de souris Balb/C possèdent une activation basale de NF- $\kappa$ B, et qui est augmentée suite à la maturation induite par les LPS (figure 11). Fait important, les GM DCs de souris NOD présentent un seul complexe de haut poids moléculaire avant et après la maturation induite par le LPS alors que les IL-4 DCs des deux types de souris montrent deux complexes suite à la maturation (figure 11). L'expression du complexe de haut poids moléculaire est augmentée chez les GM DCs de souris NOD suite à la stimulation induite par le LPS (figure 11). Les IL-4 DCs de souris NOD montrent un seul complexe de poids moléculaire plus faible (figure 11). Suite à la maturation induite par le LPS de ces cellules, en plus du complexe de faible poids moléculaire, on observe aussi une bande correspondant au complexe de haut poids moléculaire. Les GM DCs de souris Balb/C

montrent la présence des deux complexes et ce, avant et après la maturation induite par le LPS. Le complexe de faible poids moléculaire est cependant moins important que le complexe de haut poids moléculaire (figure 11). Les résultats montrent que différentes sous-unités sont impliquées dans la formation de différents complexes selon le type de souris et le type de DCs utilisées.

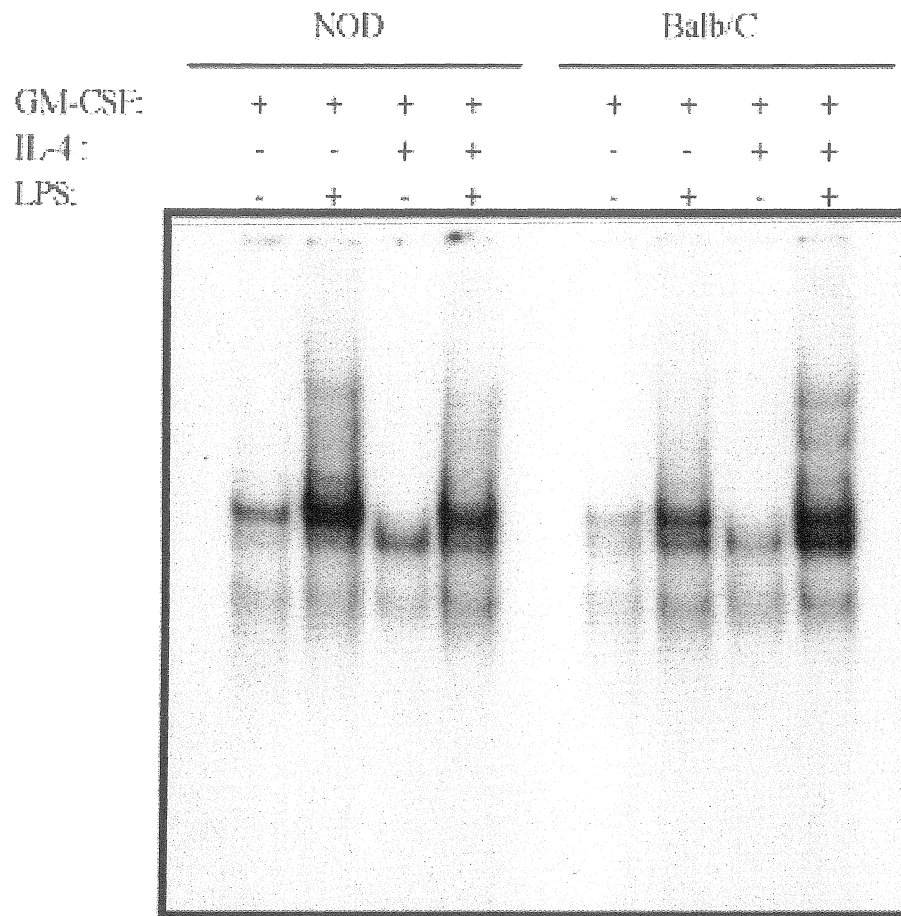


Figure 11. Gel de retardement des protéines nucléaires des différents types de DCs avec une sonde spécifique pour NF- $\kappa$ B.

Les DCs de souris NOD et de souris Balb/C ont été récoltées avant et après maturation induite par le LPS. Une isolation des protéines nucléaires a été effectuée et ces extraits ont été soumis à gel de retardement en utilisant une sonde spécifique pour le facteur de transcription NF- $\kappa$ B.

Pour définir la composition de ces différents complexes, les extraits nucléaires des cellules ont été soumis à des analyses par «supershifts». Les extraits nucléaires obtenus suite à la maturation induite par le LPS ont été utilisés puisque ces derniers possèdent une activation plus importante de NF- $\kappa$ B. L'analyse des extraits nucléaires de GM DCs de souris NOD exprimant seulement le complexe de haut poids moléculaire montre qu'il est composé de p52 et de p65 (figure 12 a). Les analyses par «supershift» ont permis de montrer que, dans les GM DCs de souris Balb/C, le complexe de faible poids moléculaire est composé de p52 et de RelB tandis que le complexe de haut poids moléculaire est composé de p52 et de p65 (figure 12 a). Pour ce qui est des IL-4 DCs de souris NOD et de souris Balb/C, les analyses ont permis de montrer que le complexe de faible poids moléculaire est composé de p52 et de RelB alors que le complexe de haut poids moléculaire est composé de p52 et de p65 (figure 12 b).

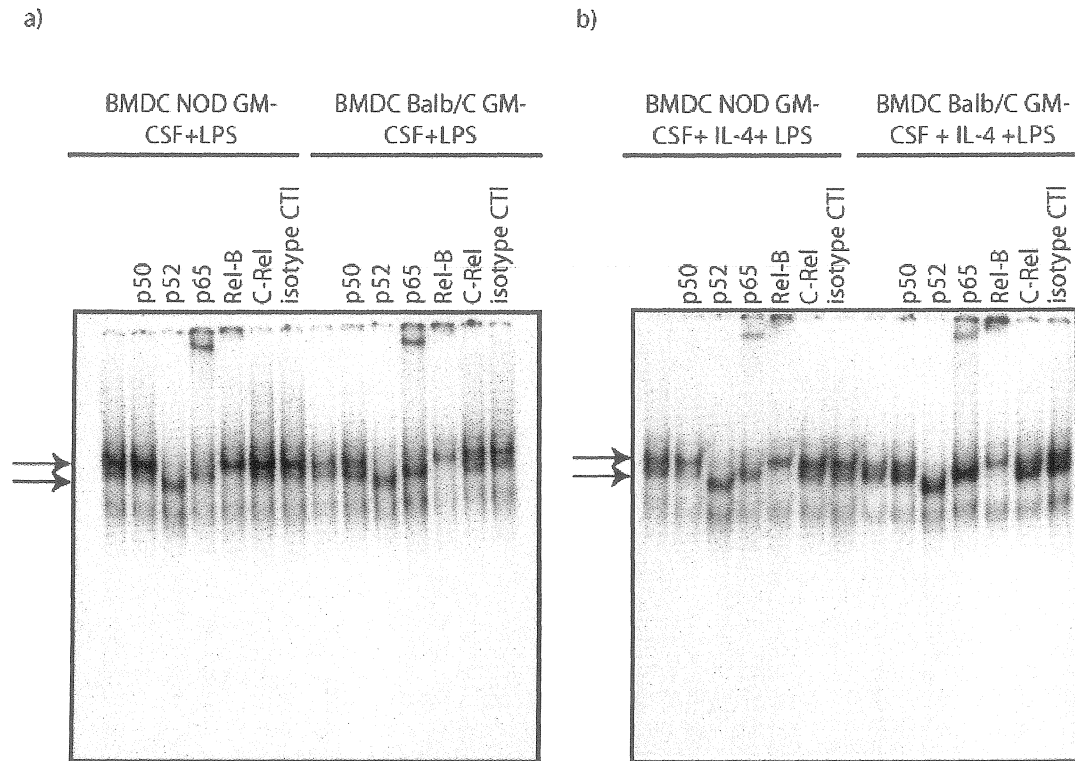


Figure 12. Supershift avec des anticorps spécifiques pour différentes sous-unités de NF- $\kappa$ B.

Les extraits nucléaires des GM DCs (a) et des IL-4 DCs (b) suite à la maturation induite par le LPS ont été analysés par supershift à l'aide d'anticorps afin de déterminer la composition des différents complexes.



## 5.8 Activation de CREB et AP-1 durant la génération de DCs tolérogènes

Les GM DCs des deux souches de souris possèdent une activation soutenue de ERK 1 et 2 et ce, avant et après l'induction de la maturation par le LPS. Dans la littérature, il a été montré que ERK peut phosphoryler c-Fos (Chen et coll., 1996; Chen et coll., 1993). Une fois activée, c-Fos peut dimériser avec Jun pour former le facteur de transcription AP-1 (Hess et coll., 2004). Nous avons donc analysé l'activation du facteur de transcription AP-1 chez les différents types de DCs. Pour ce faire, les extraits nucléaires des différents types de DCs ont été analysés par gels de retardement à l'aide d'une sonde spécifiquement reconnue par le facteur de transcription AP-1.

Les résultats de ces expériences montrent que AP-1 est faiblement activé chez les GM DCs de souris NOD et de souris Balb/C avant la maturation induite au LPS et que, suite à l'induction de la maturation, la liaison d'AP-1 est fortement augmentée (figure 13). Des résultats similaires ont été observés chez les IL-4 DCs des deux souches de souris (figure 13). Les GM DCs de souris Balb/C ont une activité basale d'AP-1 moins importante que celle retrouvée chez les GM-DCs de souris NOD (figure 13). Suite à la maturation induite par le LPS, les niveaux d'activation d'AP-1 des GM DCs de souris Balb/C rejoignent les niveaux observés chez les GM DCs de souris NOD (figure 13). En somme, AP-1 est fortement activé suite à l'induction de la maturation par le LPS chez les deux types de souris.

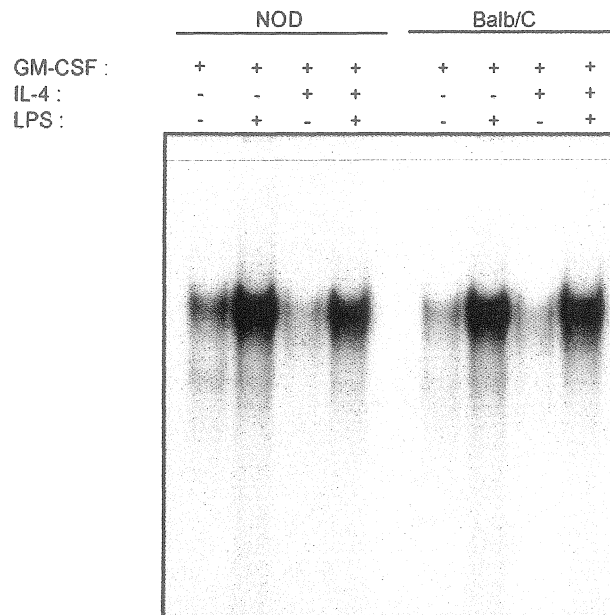


Figure 13. Gel de retardement des protéines nucléaires des différents types de DCs avec une sonde spécifique pour AP-1.

Les DCs de souris NOD et de souris Balb/C ont été récoltées avant et après maturation induite par le LPS. Une isolation des protéines nucléaires a été effectuée et ces extraits ont été soumis à gel de retardement en utilisant une sonde spécifique pour le facteur de transcription AP-1.

CREB est un facteur de transcription impliqué dans la transcription de certains gènes importants, induits durant la maturation des cellules dendritiques comme B7.1 et B7.2 (Ardeshtna et coll., 2000). En plus d'être activé par la PKA, CREB peut être activé par la MAP kinase p38. Comme la figure 14 le montre, l'activation de base de CREB est considérable chez les GM DCs des deux types de souris. Suite à la maturation au LPS, il y a une augmentation importante de l'activation de CREB chez les GM DCs. Les IL-4 DCs possèdent une activation de CREB légèrement inférieure à celle observée chez les GM DCs avant la maturation induite au LPS (figure 14). Une augmentation importante de l'activation de CREB est remarquée chez les IL-4 DCs suite à la maturation induite par le LPS et ce, chez les deux types de souris (figure 14). Il n'y a donc pas de différence majeure dans l'activation de CREB entre les différents types de DCs.

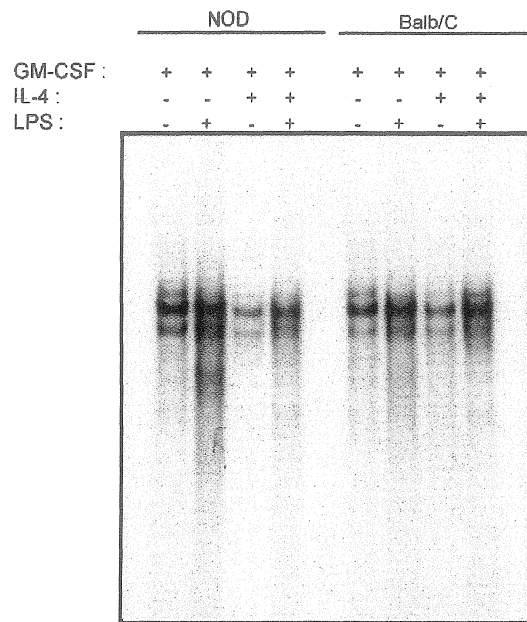


Figure 14. Gel de retardement des protéines nucléaires des différents types de DCs avec une sonde spécifique pour CREB.

Les DCs de souris NOD et de souris Balb/C ont été récoltées avant et après maturation induite par le LPS. Une isolation des protéines nucléaires a été effectuée et ces extraits ont été soumis à gel de retardement en utilisant une sonde spécifique pour le facteur de transcription CREB.

## 5.9 Activation du facteur de transcription C/EBP durant la génération de DCs toléroènes

Tout comme CREB et AP-1, le facteur de transcription C/EBP est un facteur de transcription à motif «leucine zipper». Il est impliqué dans la production d'IL-10 chez plusieurs types cellulaires (Brenner et coll., 2003), cependant, son implication au niveau de la différenciation des DCs est inconnue. Puisque les GM DCs produisent des concentrations importantes d'IL-10 (figure 9 a), nous avons investigué si C/EBP est activé durant la génération des DCs, ce qui pourrait expliquer la production de cette cytokine. Pour ce faire, des extraits nucléaires de GM DCs et des IL-4 DCs ont été effectués avant et après maturation induite par le LPS. L'analyse par gels de retardement des extraits nucléaires en utilisant une sonde spécifique pour C/EBP a permis de déterminer que l'on retrouve uniquement une activation de C/EBP chez les GM DCs après maturation induite par le LPS et ce, chez les deux types de souris (figure 15).

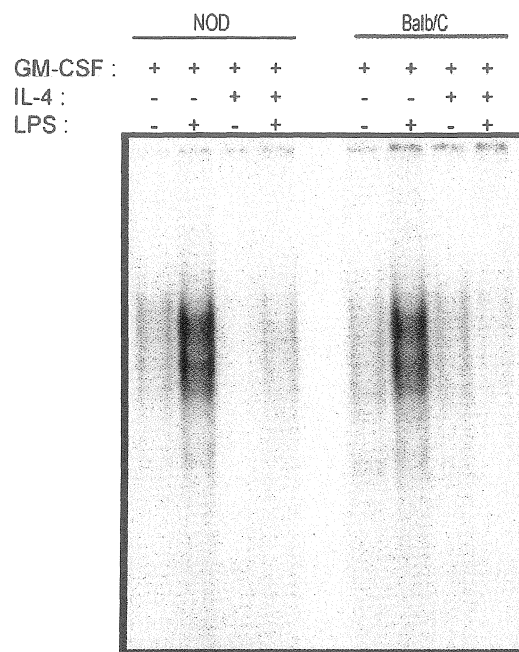


Figure 15. Gel de retardement des protéines nucléaires des différents types de DCs avec une sonde spécifique pour C/EBP. Les DCs de souris NOD et de souris Balb/C ont été récoltées avant et après maturation induite par le LPS. Une isolation des protéines nucléaires a été effectuée et ces extraits ont été soumis à gel de retardement en utilisant une sonde spécifique pour le facteur de transcription C/EBP.

Puisque C/EBP est un facteur de transcription qui comprend six isoformes (Ramji et Foka, 2002), nous avons investigué lequel (lesquels) étai(en)t responsable(s) de l'activation observée plus haut (figure 15). Pour ce faire, nous avons effectué des «supershifts». Les résultats obtenus montrent clairement que C/EBP $\beta$  est l'unique isoforme activé chez les GM DCs de souris NOD et Balb/C.

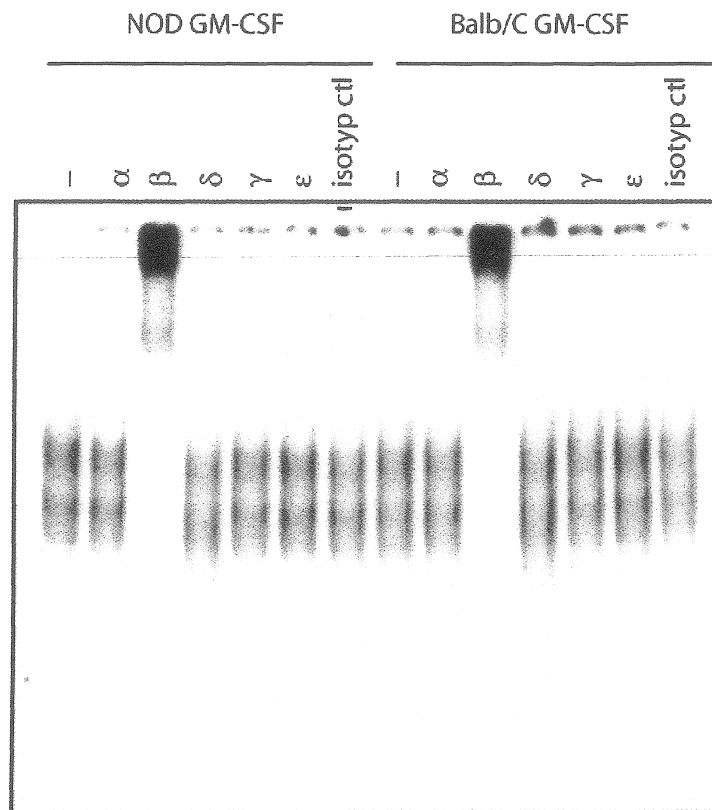


Figure 16. Supershift avec des anticorps spécifiques pour les différents isoformes de C/EBP.

Les extraits nucléaires des GM DCs suite à la maturation induite par le LPS des deux souches de souris ont été incubés avec des anticorps spécifiques afin de déterminer quels isoformes de C/EBP sont impliqués dans la formation des différents complexes, puis un gel de retardement a été effectué avec une sonde spécifique pour C/EBP.



## 6 Discussion

Dans notre laboratoire, nous avons montré qu'un traitement au GM-CSF permettait de prévenir le développement du diabète de type 1 chez la souris NOD. Ce traitement permet de générer une sous-population de cellules dendritiques tolérogènes qui résistent à la maturation et qui produisent des concentrations importantes d'IL-10. Des transferts adoptifs ont permis de montrer que ces cellules dendritiques sont essentielles à la protection des souris NOD contre le développement du diabète de type 1 (Gaudreau et coll., données non publiées)

Des études antérieures ont montré que la culture *in vitro* de la moelle osseuse avec de faible quantité de GM-CSF permet de générer des cellules dendritiques tolérogènes (Feili-Hariri et Morel, 2001; Inaba et coll., 1993). Les objectifs de ce projet étaient de générer *in vitro* des cellules dendritiques tolérogènes et d'analyser leurs fonctions, leurs phénotypes ainsi que d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans ces différents aspects. Dans cette étude, nous avons généré *in vitro* des DCs de souris NOD et de souris Balb/C en présence de GM-CSF (GM DCs) ou en présence de GM-CSF et d'IL-4 (IL-4 DCs).

Nous avons tout d'abord analysé le phénotype des cellules générées *in vitro*. Les résultats présentés dans la figure 5 montrent que les GM DCs des deux types de souris ne présentent pas une augmentation de l'expression de B7.1 et de B7.2 suite à la maturation induite par le LPS. Les GM DCs de souris Balb/C montrent cependant une augmentation

importante de l'expression de la molécule CD40 (figure 5). Quant à elles, les IL-4 DCs des deux souches montrent une augmentation importante de l'expression des molécules de co-stimulation suite à la maturation induite par le LPS (figure 5). L'augmentation de l'expression de ces molécules est un indicateur de la maturation des DCs (Banchereau et coll., 2000; Steinman et Hemmi, 2006).

Une autre caractéristique des DCs tolérogènes est que celles-ci activent moins les lymphocytes T que les IL-4 DCs «conventionnelles» (Rutella et coll., 2006; Steinman et coll., 2000). Pour vérifier si les GM DCs activent moins les lymphocytes T que les IL-4 DCs, nous avons pulsés les DCs avec un peptide, le NRP-A7 qui est spécifiquement reconnu par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> des souris transgéniques 8.3-NOD. Nos résultats montrent que les GM DCs de souris NOD ont une faible capacité à activer les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et ce, avant ou après la maturation induite par le LPS comparativement aux IL-4 DCs des mêmes souris (figure 6 a). Les GM DCs de souris Balb/C ne sont pas en mesure d'activer la prolifération des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et ce, avant ou après la maturation induite par le LPS (figure 6 b). Les GM DCs de souris NOD sont donc plus efficaces à induire l'activation des lymphocytes T que les GM DCs de souris Balb/C (figure 6 a et b). Ceci est peut-être dû au fait que, tel que mentionné dans la littérature, les DCs de souris NOD sont dans un état de maturation plus avancée que les DCs de souris Balb/C (Feili-Hariri et coll., 1999). De plus, ces résultats montrent que les niveaux d'activation des lymphocytes T correspondent aux niveaux d'expression des molécules de co-stimulation.

Par la suite, les surnageants des co-cultures ont été analysés par ELISA pour déterminer la nature et les concentrations de cytokines produites par les lymphocytes T. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> activés par les GM DCs de souris NOD avant et après maturation induite par le LPS sécrètent très peu d'IL-2 comparativement aux lymphocytes T activés par les IL-4 DCs provenant des mêmes souris (figure 6 c). Les GM DCs de souris Balb/C n'induisent pas la production d'IL-2 par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et ce, avant ou après maturation induite par le LPS (figure 6 d). Les IL-4 DCs de souris Balb/C induisent une production d'IL-2 par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> seulement après la maturation induite par le LPS (figure 6 d). L'IL-2 est une cytokine impliquée dans la prolifération des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Les niveaux produits par les lymphocytes T (figures 6 c et d) correspondent aux niveaux de prolifération de ces mêmes lymphocytes T (figure 6 a et b).

Nous avons aussi analysé la production d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, qui est associée à la polarisation d'une réponse de type Th1. Les résultats obtenus montrent que les GM DCs de souris NOD induisent une production plus importante d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> suite à la maturation induite au LPS (figure 6 e). Les IL-4 DCs de souris NOD induisent aussi une production plus élevée d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T suite à la maturation par le LPS (figure 6 e). De base, les IL-4 DCs de souris NOD induisent une production plus importante d'IFN- $\gamma$  que les GM DCs (figure 6 e). Les DCs des souris Balb/C n'induisent pas de sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Des résultats similaires ont été observés par le groupe de Tisch (Poligone et coll., 2002). Ils ont observé que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ne produisent pas d'IFN- $\gamma$  suite à la stimulation

par un faible nombre de DCs de souris Balb/C. Lorsque le nombre de DCs augmente par rapport au nombre de lymphocytes T, la production d'IFN- $\gamma$  augmente aussi (Poligone et coll., 2002).

Par la suite, nous avons investigué la capacité de phagocytose des différentes sous-populations de cellules dendritiques. Les DCs immatures possèdent une capacité importante de phagocytose et elles perdent cette capacité lorsqu'elles deviennent matures (Mellman et Steinman, 2001). Les GM DCs de souris NOD et Balb/C ont une capacité de phagocytose plus importante après la maturation induite par le LPS qu'avant, contrairement aux IL-4 DCs des deux souches de souris (figure 7 a et b).

L'étude du phénotype et des fonctions des GM DCs montre qu'il s'agit effectivement de cellules dendritiques tolérogènes. En effet, ces résultats montrent que les GM DCs de souris NOD et de souris Balb/C résistent à la maturation induite par le LPS puisqu'elles ne présentent pas d'augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation ce qui est caractéristique de DCs tolérogènes immatures ou semi-matures (Lutz et Schuler, 2002; Rutella et coll., 2006). Les GM DCs des deux souches de souris gardent des fonctions de cellules dendritiques immatures alors que les IL-4 DCs acquièrent des fonctions ainsi que le phénotype des DCs matures. Les GM DCs augmentent leur capacité de phagocytose mais n'acquièrent pas une capacité importante d'activation des lymphocytes T alors que les IL-4 DCs perdent leur capacité de phagocytose mais acquièrent la capacité d'activer les lymphocytes T.

Un fait intéressant à noter est que les IL-4 DCs de souris Balb/C ne mûrissent pas toutes au même niveau. Une sous-population de ces cellules semblent rester dans un état immature, tandis que chez les IL-4 DCs de souris NOD, toutes les cellules mûrissent au même niveau (figure 5). Ces données viennent appuyer celles déjà publiées démontrant que les DCs de souris NOD sont dans un plus avancé de maturation que les DCs d'autres souches de souris (Feili-Hariri et Morel, 2001; Poligone et coll., 2002). La sous-population de DCs immatures retrouvée chez les IL-4 DCs de souris Balb/C peut être responsable de la production d'IL-10 (figure 9 a) observée lorsque ces cellules sont stimulées au LPS.

Par la suite, nous avons analysé l'expression de la molécule F4/80, cette molécule est très importante pour l'induction et le maintien de la tolérance ainsi que pour la génération de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> Tregs (van den Berg et Kraal, 2005). Cette fonction de F4/80 a été démontrée grâce à des souris déficientes en cette protéine (Lin et coll., 2005). Un pourcentage important des GM DCs et des IL-4 DCs de souris NOD et de souris Balb/C expriment F4/80 avant l'activation au LPS (figure 8 a). Un pourcentage plus élevé de cellules exprimant F4/80 est retrouvé chez les souris NOD comparativement aux cellules de souris Balb/C. Une étude a montré que les monocytes de souris NOD ont un défaut au niveau de leur différenciation en DCs. Effectivement les monocytes des souris NOD se différencient préférentiellement en macrophages, exprimant F4/80 (Nikolic et coll., 2005). Une étude récente montre que les DCs et les macrophages peuvent originer d'un précurseur commun au niveau de la moelle osseuse (Fogg et coll., 2006). La génération préférentielle de macrophages pourrait aussi être un

phénomène retrouvé au niveau de la moelle osseuse ce qui permettrait d'expliquer l'augmentation du pourcentage de cellules exprimant F4/80 chez la souris NOD. Plusieurs études ont montré que la génération de DCs à partir de la moelle osseuse de souris NOD donnait un nombre inférieure de DCs comparativement à d'autres souches de souris (Feili-Hariri et Morel, 2001). Cette différence est peut-être attribuable à une génération importante de macrophages. Dans nos expériences, nous avons utilisé uniquement les cellules non-adhérentes qui expriment CD11c. Les macrophages et les autres cellules qui n'expriment pas CD11c ont une forte adhérence au pétri. Cette différence est très importante puisqu'elle permet d'obtenir une population de cellules fortement enrichie en DCs. Suite à la maturation induite par le LPS, les GM DCs de souris NOD et de souris Balb/C conservent un pourcentage élevé de cellules exprimant de F4/80 tandis que les IL-4 DCs perdent majoritairement l'expression de cette molécule (figure 8 b). Cette expression de F4/80 combinée au phénotype immature des GM DCs montre que celles-ci pourraient être impliquées dans le développement et dans la maintien de la tolérance. Pour ce qui est des IL-4 DCs, des études ont démontré que les DCs isolées de la rate de souris C57BL/6 subissant une maturation *in vitro* perdent l'expression de F4/80 (Leenen et coll., 1998). Un phénomène similaire a aussi été observé au niveau des cellules de Langerhans, ces cellules perdent l'expression de F4/80 suite à la phagocytose d'antigènes et deviennent des DCs matures (McKnight et Gordon, 1998). Les résultats obtenus montrent, une fois de plus, que les IL-4 DCs des deux souches de souris possèdent un profil de maturation normal.

En plus des différences fonctionnelles, les GM DCs ont un profil de sécrétion de cytokines différent des IL-4 DCs. Les GM DCs de souris NOD et de souris Balb/C produisent des concentrations importantes d'IL-10 (figure 9 a). Les IL-4 DCs de souris Balb/C en produisent des concentrations moindres que les GM DCs (figure 9 a). La production d'IL-10 peut avoir plusieurs effets anti-inflammatoires dont l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T et l'induction de Tregs (Chen, 2006; Rutella et coll., 2006). Les IL-4 DCs des deux souches de souris produisent des cytokines pro-inflammatoires comme de l'IL-12p70 (figure 9 b) et de l'IFN- $\gamma$  (figure 9 b). Les IL-4 DCs de souris NOD produisent des quantités plus importantes d'IL-12p70 et d'IFN- $\gamma$  que les IL-4 DCs de souris Balb/C. Les différents types de DCs produisent des quantités similaires d'IL-6. Les IL-4 DCs et les GM DCs de souris NOD produisent des quantités similaires de TNF- $\alpha$ . Des résultats similaires sont observés avec les GM DCs et les IL-4 DCs de souris Balb/C, cependant, les niveaux de sécrétion de TNF- $\alpha$  sont plus élevés chez les cellules de souris NOD comparativement aux cellules de souris Balb/C. L'IL-6 est une cytokine ayant plusieurs fonctions au niveau du système immunitaire. De plus, la production d'IL-6 peut être induite par le facteur de transcription AP-1 (Saccani et coll., 2001). Aucune différence n'est observée pour ce qui est de l'activation d'AP-1 entre les GM DCs et les IL-4 DCs (figure 13), ce qui pourrait expliquer la production similaire de cette cytokine. Pour ce qui est du TNF- $\alpha$ , cette cytokine permet le recrutement des DCs au niveau des ganglions lymphatiques là où elles peuvent activer les lymphocytes (Bach et Chatenoud, 2001).

Les GM DCs ont plusieurs caractéristiques de DCs tolérogènes, cependant, elles produisent à la fois des cytokines favorisant l'activation du système immunitaire (IL-6 et TNF- $\alpha$ ) et une quantité importante d'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire. Pour comprendre l'effet des ces différentes cytokines des essais *in vivo* devront être effectués. La différence entre une réponse immunitaire ou l'inhibition d'une réponse immunitaire *in vivo* résulte d'une balance entre l'effet de médiateurs pro-inflammatoires et de l'effet des médiateurs inflammatoires (Matzinger, 2002). L'utilisation d'un système *in vitro* isole les différentes composantes retrouvées normalement dans une réponse immunitaire. L'étude de ces composantes individuellement ne représente pas ce qui est retrouvé dans des conditions physiologiques puisqu'une réponse immunitaire peut être affectée par plusieurs médiateurs simultanément. Les cytokines pro-inflammatoires peuvent voir leurs effets être inhibés par les cytokines anti-inflammatoires et vice-versa *in vivo* (Matzinger, 2002).

Comme les GM DCs et les IL-4 DCs ont des fonctions différentes et produisent des cytokines différentes, nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires pouvant expliquer ces différences. Nous avons commencé par l'étude de l'activation des MAP kinases. ERK 1 et 2 et p38 sont impliquées dans la maturation des DCs ainsi que dans la production de cytokines (Arrighi et coll., 2001; Mathur et coll., 2004; Puig-Kroger et coll., 2001). Suite à la maturation induite par le LPS, les GM DCs gardent un niveau de phosphorylation de ERK similaire à celui observé avant l'induction de la maturation, et ce chez les deux souches de souris (figure 10). Chez les IL-4 DCs, une très faible phosphorylation de ERK 1 et 2 est observée suite à la maturation induite par le LPS



(figure 10). Cette différence est très importante puisque ERK 1 et 2 peut être responsable de la production d'IL-10 (Puig-Kroger et coll., 2001). Seules les GM DCs produisent de l'IL-10 en concentration importante en présence de LPS (figure 9 a) ce qui suggère que ERK 1 et 2 est impliqué dans la sécrétion de cette cytokine. L'inhibition de ERK 1 et 2, à l'aide d'un inhibiteur pharmacologique, le U0126, permet de diminuer la production d'IL-10 par les GM DCs d'environ 50% (données non présentées). Ces résultats laissent présager que non seulement ERK 1 et 2 mais d'autres voies de signalisation sont responsables de la production d'IL-10.

Par la suite, nous avons étudié la phosphorylation de p38. Cette MAP kinase est importante pour la maturation des DCs (Arrighi et coll., 2001; Mathur et coll., 2004). Les GM DCs de souris NOD montrent une phosphorylation importante de p38 qui diminue suite à l'induction de la maturation par le LPS (figure 10). Les IL-4 DCs de souris NOD ne montrent aucune phosphorylation de p38 avant et après maturation induite par le LPS. Pour ce qui est des GM DCs de souris Balb/C, une augmentation de la phosphorylation de p38 est observée suite à la maturation induite par le LPS. Les IL-4 DCs de souris Balb/C montrent une diminution de la phosphorylation de p38 suite à la maturation induite au LPS. Ces résultats sont un peu surprenant, puisque p38 est essentiel à la maturation et que son activation est retrouvée seulement chez les GM DCs des souris NOD, cellules qui résistent à la maturation. Pour comprendre le rôle de p38 dans les GM DCs, nous avons fait des essais où nous avons inhibé p38 tout au long de la différenciation des GM DCs de souris NOD. Les résultats obtenus montrent que les fonctions et la production de cytokines de ces cellules ne sont pas affectées par l'inhibition de p38 (données non

présentées). Ces résultats préliminaires semblent aussi démontrer que l'activation de p38 n'est pas essentielle à la génération de DCs tolérogènes chez la souris NOD. Pour ce qui est des IL-4 DCs de souris NOD, où aucune phosphorylation de p38 n'est observée, il se peut que l'activation de p38 soit déjà terminée (figure 10). En effet, l'activation de p38 ne peut être que transitoire car une activation soutenue de p38 favorise l'apoptose (Cai et coll., 2006). Comme les DCs de souris NOD sont dans un état plus avancé de maturation que les DCs de souris Balb/C (Feili-Hariri et Morel, 2001; Poligone et coll., 2002), il se peut que les IL-4 DCs de Balb/C soient dans un stade de maturation qui requiert l'activation de p38 et que les IL-4 DCs de souris NOD aient déjà terminé ce stade de maturation. Grâce à l'inhibiteur pharmacologique SB203580, nous pourrions inhiber p38 à différents moments au cours de la génération des DCs et étudier les répercussions de cette inhibition sur les fonctions, le phénotypes et la production de cytokines par les IL-4 DCs de souris NOD et de souris Balb/C.

Pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans les fonctions et la production des différentes cytokines chez les différentes sous-populations de DCs, nous avons analysé l'activation des différents facteurs de transcription qui pourraient être responsables de ces différences. Nous avons d'abord analysé l'activation de NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription impliqué dans la maturation des DCs (Rescigno et coll., 1998). En étudiant l'activation de ce facteur et en analysant les sous-unités impliquées dans la formation des complexes de NF- $\kappa$ B, nous voulions comprendre les mécanismes moléculaires qui permettent aux GM DCs de garder leur phénotype immature ou semi-mature. Nous avons observé que les GM DC de souris NOD et Balb/C

avaient une activation faible de NF- $\kappa$ B et que cette activation était augmentée suite à la maturation induite par le LPS. Des résultats similaires sont obtenus avec les IL-4 DCs de souris NOD et Balb/C. Lorsque nous avons analysés les protéines formant les complexes de NF- $\kappa$ B, nous avons observé que les GM DCs de souris NOD possèdent un seul complexe composé de p52 et p65 (figure 12). Les GM DCs de souris Balb/C (Yanagawa et Onoe, 2006) possédaient le même complexe, mais avaient aussi un autre complexe qui est composé de p52 et RelB. Le complexe p52/RelB est beaucoup moins important que celui formé de p52/p65 (figure 12). Les IL-4 DCs des deux types de souris possèdent deux complexes soient p52/p65 et p52/RelB. L'activation de RelB chez les IL-4 DCs est importante puisque cette sous-unité de NF- $\kappa$ B a été démontré pour être essentielle à la maturation des DCs (Yanagawa et Onoe, 2006). Les GM DCs de souris NOD ne possèdent pas de RelB activé, ce qui peut expliquer que ces cellules n'ont aucune augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation suite à la maturation induite par le LPS. Les GM DCs de souris Balb/C possèdent une faible activation de RelB, et possèdent aussi une augmentation de l'expression de CD40 suite à la maturation induite par le LPS (figure 5). L'augmentation de l'expression de RelB peut être responsable de l'augmentation de l'expression de CD40 car une étude a démontré que les DCs générées à partir de souris RelB  $-/-$  expriment moins de CD40 et des molécules de CMH de classes I et II (Martin et coll., 2003).

Par la suite, nous avons analysé l'activation de deux autres facteurs de transcription qui peuvent aussi être impliqués dans la différenciation des DCs. Nous avons tout d'abord étudié l'activation du facteur de transcription AP-1. Ce facteur de transcription peut être activé par plusieurs kinases dont ERK et JNK. Les GM DCs

montrent une activation soutenue de ERK 1 et 2 chez les deux types de souris (figure 10). L'étude de ce facteur de transcription montre que les GM DCs et les IL-4 DCs des deux souches de souris possèdent une activation basale d'AP-1 qui est fortement augmentée suite à la maturation induite par le LPS (figure 13). L'activation d'AP-1 chez les GM DCs de souris NOD avant la maturation est plus importante que celle observée chez les GM DCs de souris Balb/C. La fonction exacte d'AP-1 dans la génération et la différenciation des DCs n'est pas définie dans la littérature. Cependant, les résultats présentés dans cette étude (figure 10) suggèrent que ce facteur n'est pas impliqué dans la différenciation et la génération de DCs tolérogènes.

Nous avons ensuite étudié l'activation du facteur de transcription CREB. Ce facteur est impliqué dans l'expression des molécules de co-stimulation de la famille B7 (Ardeshtna et coll., 2000) ce qui lui confère un rôle important dans la régulation des fonctions des DCs matures. Comme les GM DCs ne montrent pas d'augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation (figure 5) suite à la maturation, nous avons émis l'hypothèse que l'activation de ce facteur de transcription pouvait être inhibée chez ces cellules. Les résultats présentés en figure 14 montrent que les GM DCs des deux souches de souris ont une activité basale de CREB, telle que démontrée par l'intensité de la liaison à l'ADN. Cette activité est augmentée suite à la maturation au LPS. Des résultats similaires sont observés chez les IL-4 DCs des deux souches de souris. Pour avoir une activité transcriptionnelle optimale, il a été montré que CREB doit être phosphorylé afin de recruter le co-activateur transcriptionnel CBP (Mayr et Montminy, 2001). Nous avons donc analysé la phosphorylation de ce facteur de transcription. Les

résultats préliminaires montrent qu'il n'y a pas de phosphorylation de CREB avant la maturation au LPS chez les GM DCs et les IL-4 DCs des deux souches de souris (données non présentées). Suite à l'induction de la maturation, il y a phosphorylation de CREB, cependant, aucune différence n'est observée entre les GM DCs et les IL-4 DCs de souris NOD et Balb/C (données non présentées). Puisque les niveaux de la phosphorylation et de liaison à l'ADN de CREB (figure 10) sont similaires entre les GM DCs et les IL-4 DCs des deux souches de souris, ce facteur n'est donc pas responsable des différences majeures remarquées au niveau de l'expression des molécules de co-stimulation (figure 5). Des études ont montré que d'autres facteurs de transcription pouvaient intervenir dans l'expression des gènes codant pour les molécules de co-stimulation. Récemment, une étude a montré que RelB participait à la régulation de l'expression des molécules de co-stimulation car les DCs déficientes en RelB expriment des niveaux inférieurs de ces molécules comparativement aux souris contrôles (Martin et coll., 2003). Ces résultats suggèrent l'existence d'une coopération entre CREB et RelB. Chez les GM DCs, suite à l'induction de la maturation, on observe une activation importante de CREB (figure 10) mais aucune activation de RelB n'est observée (figure 12). Comme un des deux facteurs n'est pas activé, il n'y a de transcription des gènes codant pour les molécules de co-stimulation (figure 5).

Puisque l'activation de ERK n'est responsable que d'environ 50% de la production d'IL-10 chez les GM DCs, nous avons tenté de déterminer si l'activation d'un autre sentier de signalisation pouvait être responsable de la production de cette cytokine. Nous avons étudié l'activation du facteur de transcription C/EBP qui n'est pas connu pour être

impliqué dans la maturation des DCs mais qui est responsable de la production d'IL-10 dans plusieurs types cellulaires (Brenner et coll., 2003). Les résultats obtenus montrent effectivement qu'il y a une activation importante de C/EBP suite à la maturation induite par le LPS chez les GM DCs des deux souches de souris (figure 15). Le facteur de transcription C/EBP peut être formé de six sous-unités, nous avons donc analysé qu'elle(s) sous-unité(s) est(sont) impliquée(s) dans la formation du complexe observé. Les résultats présentés en figure 16 montrent que le complexe de C/EBP n'est formé que de la sous-unité  $\beta$  dans notre système. C/EBP $\beta$  possède trois isoformes LIP, LAP et LAP\*. LIP est une forme inhibitrice de C/EBP (Descombes et Schibler, 1991). Des expériences supplémentaires seront nécessaires afin de déterminer quel(s) isoforme(s) est(sont) impliqué(s) dans notre système. De plus, des expériences utilisant un inhibiteur de C/EBP doivent être effectuées afin de déterminer la fonction de C/EBP dans la génération des DCs tolérogènes. Cet inhibiteur consiste en un motif de dimérisation de C/EBP qui ne contient pas le domaine de liaison à l'ADN et empêche donc la liaison du dimère aux séquences reconnues par ce facteur de transcription, et donc, la transcription des gènes dépendant de celui-ci. Le plasmide qui contient la séquence codant pour cet inhibiteur sera nucléofecté chez les GM DCs avant la maturation induite par le LPS. Par la suite les fonctions, le phénotype et la production de cytokines seront étudiés afin de déterminer quel(s) aspect(s) des DCs tolérogènes est(sont) changé(s) suite à l'inhibition de C/EBP. Ces expériences permettront de déterminer les fonctions de C/EBP dans la génération des DCs tolérogènes.

## 7 Conclusion

En somme, les résultats présentés dans cette étude montrent que les DCs générées *in vitro* avec du GM-CSF seul (GM DCs) et les DCs générées en présence de GM-CSF et d'IL-4 (IL-4 DCs) de souris NOD et de souris Balb/C ont des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles différentes. Les GM DCs des deux souches de souris ne montrent pas d'augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation, n'activent pas les lymphocytes T et conservent une capacité importante de phagocytose suite à l'induction de la maturation par le LPS. Ces cellules sont donc des DCs tolérogènes.

L'étude des mécanismes moléculaires nous a permis de proposer que ERK et C/EBP seraient impliqués dans la génération des DCs tolérogènes. L'activation de ERK est soutenue chez les GM DCs et est responsable d'une partie de L'IL-10 par ces DCs. Le facteur de transcription C/EBP pourrait aussi être responsable de la production de cette cytokine, car son activation est observée seulement chez les GM DCs. Le complexe de C/EBP est formé de la sous-unité  $\beta$  qui peut avoir à la fois des effets activateurs et inhibiteurs sur l'expression génique. L'étude des fonctions de C/EBP dans la génération et dans les fonctions des DCs tolérogènes pourrait permettre de comprendre pourquoi ces DCs ont des fonctions si différentes *in vivo*. De plus, les GM DCs ne possèdent pas d'activation du facteur de transcription RelB ce qui permet d'expliquer que ces cellules ne montrent pas d'augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation et possèdent une faible capacité d'activation des lymphocytes T.

Quant aux IL-4 DCs des deux types de souris, elles montrent une forte augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation, activent les lymphocytes T et perdent leur capacité de phagocytose suite à la maturation induite par le LPS. Ces cellules représentent donc des cellules dendritiques «conventionnelles» qui mûrissent de façon normale suite à l'induction au LPS. La modulation des fonctions de ces DCs peut s'expliquer par une activation importante de CREB et de la sous-unité RelB du facteur de transcription NF- $\kappa$ B ainsi que par l'absence d'activation de C/EBP.

L'étude des mécanismes moléculaires permettant la génération de DCs tolérogènes *in vitro* permet de mieux comprendre les fonctions de ces cellules et ainsi permet d'envisager de nouvelles avenues thérapeutiques dans le traitement et la prévention du diabète de type 1 et peut-être d'autres pathologies auto-immunes.



## 8 Remerciements

Je voudrais remercier le Dr. Amrani de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je tiens à le remercier de m'avoir fait confiance avec ce projet qui pouvait sembler un peu étrange au départ. Merci aussi pour toutes les discussions qui m'aident à avancer dans mes travaux mais aussi dans tous les aspects de la sciences.

Un merci particulier à Mike, pour tout le travail que tu as fait pour ce projet, sans toi, je n'y serais jamais arrivé. Merci aussi d'être qui tu es, toujours le bon mot pour remonter le moral et toujours une blague en réserve pour faire rire les gens. Merci Mike!

Je tiens aussi à remercier mes parents et ma soeur qui ont toujours été là quand c'était difficile et qui m'ont encouragé tout au long de ma maîtrise.

Je remercie Alex pour m'avoir aider au point de vue professionnel mais surtout au point de vue personnel. Merci de m'appuyer sans relâche et d'avoir confiance en moi. Merci aussi pour tout ce que tu as fait pour moi au cours de ces dernières années.

En terminant, j'aimerais aussi remercier les membres du laboratoire pour leur appui.

## 9 Références

- Albert, M.L., S.F. Pearce, L.M. Francisco, B. Sauter, P. Roy, R.L. Silverstein, et N. Bhardwaj. 1998a. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via  $\alpha$  and  $\beta$ 5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med.* 188:1359-68.
- Albert, M.L., B. Sauter, et N. Bhardwaj. 1998b. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature.* 392:86-9.
- Amrani, A., J. Verdaguer, B. Anderson, T. Utsugi, S. Bou, et P. Santamaria. 1999. Perforin-independent beta-cell destruction by diabetogenic CD8(+) T lymphocytes in transgenic nonobese diabetic mice. *J Clin Invest.* 103:1201-9.
- Andre, I., A. Gonzalez, B. Wang, J. Katz, C. Benoist, et D. Mathis. 1996. Checkpoints in the progression of autoimmune disease: lessons from diabetes models. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:2260-3.
- Angerer, N.D., Y. Du, D. Nalbant, et S.C. Williams. 1999. A short conserved motif is required for repressor domain function in the myeloid-specific transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein epsilon. *J Biol Chem.* 274:4147-54.
- Ardavin, C., L. Wu, C.L. Li, et K. Shortman. 1993. Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature.* 362:761-3.
- Ardeshna, K.M., A.R. Pizzey, S. Devereux, et A. Khwaja. 2000. The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Blood.* 96:1039-46.
- Arias, J., A.S. Alberts, P. Brindle, F.X. Claret, T. Smeal, M. Karin, J. Feramisco, et M. Montminy. 1994. Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. *Nature.* 370:226-9.
- Arnold-Schild, D., D. Hanau, D. Spehner, C. Schmid, H.G. Rammensee, H. de la Salle, et H. Schild. 1999. Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. *J Immunol.* 162:3757-60.
- Arrighi, J.F., M. Rebsamen, F. Rousset, V. Kindler, et C. Hauser. 2001. A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers. *J Immunol.* 166:3837-45.

- Atkinson, M.A., et E.H. Leiter. 1999. The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets? *Nat Med.* 5:601-4.
- Ato, M., S. Stager, C.R. Engwerda, et P.M. Kaye. 2002. Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. *Nat Immunol.* 3:1185-91.
- Bach, J.F. 2005. Infections and autoimmune diseases. *J Autoimmun.* 25 Suppl:74-80.
- Bach, J.F., et L. Chatenoud. 2001. Tolerance to islet autoantigens in type 1 diabetes. *Annu Rev Immunol.* 19:131-61.
- Baekkeskov, S., H.J. Aanstoot, S. Christgau, A. Reetz, M. Solimena, M. Cascalho, F. Folli, H. Richter-Olesen, et P. De Camilli. 1990. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature.* 347:151-6.
- Baekkeskov, S., J.H. Nielsen, B. Marner, T. Bilde, J. Ludvigsson, et A. Lernmark. 1982. Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. *Nature.* 298:167-9.
- Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y.J. Liu, B. Pulendran, et K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 18:767-811.
- Banchereau, J., et R.M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 392:245-52.
- Battaglia, M., S. Gregori, R. Bacchetta, et M.G. Roncarolo. 2006. Tr1 cells: from discovery to their clinical application. *Semin Immunol.* 18:120-7.
- Bell, D., J.W. Young, et J. Banchereau. 1999. Dendritic cells. *Adv Immunol.* 72:255-324.
- Bell, G.I., S. Horita, et J.H. Karam. 1984. A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes.* 33:176-83.
- Bendelac, A., C. Carnaud, C. Boitard, et J.F. Bach. 1987. Syngeneic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates. Requirement for both L3T4+ and Lyt-2+ T cells. *J Exp Med.* 166:823-32.
- Bennett, S.T., A.M. Lucassen, S.C. Gough, E.E. Powell, D.E. Undlien, L.E. Pritchard, M.E. Merriman, Y. Kawaguchi, M.J. Dronsfield, F. Pociot, et et coll. 1995. Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. *Nat Genet.* 9:284-92.
- Brenner, S., S. Prosch, K. Schenke-Layland, U. Riese, U. Gausmann, et C. Platzer. 2003. cAMP-induced Interleukin-10 promoter activation depends on CCAAT/enhancer-binding protein expression and monocytic differentiation. *J Biol Chem.* 278:5597-604.

- Brusko, T.M., C.H. Wasserfall, M.J. Clare-Salzler, D.A. Schatz, et M.A. Atkinson. 2005. Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes*. 54:1407-14.
- Cai, B., S.H. Chang, E.B. Becker, A. Bonni, et Z. Xia. 2006. p38 MAP kinase mediates apoptosis through phosphorylation of BimEL at Ser-65. *J Biol Chem*. 281:25215-22.
- Castellino, F., G. Zhong, et R.N. Germain. 1997. Antigen presentation by MHC class II molecules: invariant chain function, protein trafficking, and the molecular basis of diverse determinant capture. *Hum Immunol*. 54:159-69.
- Cejas, P.J., L.M. Carlson, D. Kolonias, J. Zhang, I. Lindner, D.D. Billadeau, L.H. Boise, et K.P. Lee. 2005. Regulation of RelB expression during the initiation of dendritic cell differentiation. *Mol Cell Biol*. 25:7900-16.
- Cella, M., A. Engering, V. Pinet, J. Pieters, et A. Lanzavecchia. 1997. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature*. 388:782-7.
- Chen, R.H., P.C. Juo, T. Curran, et J. Blenis. 1996. Phosphorylation of c-Fos at the C-terminus enhances its transforming activity. *Oncogene*. 12:1493-502.
- Chen, R.H., R. Tung, C. Abate, et J. Blenis. 1993. Cytoplasmic to nuclear signal transduction by mitogen-activated protein kinase and 90 kDa ribosomal S6 kinase. *Biochem Soc Trans*. 21:895-900.
- Chen, W. 2006. Dendritic cells and (CD4<sup>+</sup>)CD25<sup>+</sup> T regulatory cells: crosstalk between two professionals in immunity versus tolerance. *Front Biosci*. 11:1360-70.
- Chorny, A., E. Gonzalez-Rey, A. Fernandez-Martin, D. Pozo, D. Ganea, et M. Delgado. 2005. Vasoactive intestinal peptide induces regulatory dendritic cells with therapeutic effects on autoimmune disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:13562-7.
- Christie, M.R., S. Genovese, D. Cassidy, E. Bosi, T.J. Brown, M. Lai, E. Bonifacio, et G.F. Bottazzo. 1994. Antibodies to islet 37k antigen, but not to glutamate decarboxylase, discriminate rapid progression to IDDM in endocrine autoimmunity. *Diabetes*. 43:1254-9.
- Chrivia, J.C., R.P. Kwok, N. Lamb, M. Hagiwara, M.R. Montminy, et R.H. Goodman. 1993. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature*. 365:855-9.
- Comb, M., N.C. Birnberg, A. Seasholtz, E. Herbert, et H.M. Goodman. 1986. A cyclic AMP- and phorbol ester-inducible DNA element. *Nature*. 323:353-6.
- Cooper, C., A. Henderson, S. Artandi, N. Avitahl, et K. Calame. 1995. Ig/EBP (C/EBP gamma) is a transdominant negative inhibitor of C/EBP family transcriptional activators. *Nucleic Acids Res*. 23:4371-7.

- Corinti, S., C. Albanesi, A. Ia Sala, S. Pastore, et G. Girolomoni. 2001. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J Immunol.* 166:4312-8.
- Cresswell, P. 1996. Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell.* 84:505-7.
- Cudworth, A.G., et J.C. Woodrow. 1975. HL-A system and diabetes mellitus. *Diabetes.* 24:345-9.
- De Smedt, T., B. Pajak, E. Muraille, L. Lespagnard, E. Heinen, P. De Baetselier, J. Urbain, O. Leo, et M. Moser. 1996. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J Exp Med.* 184:1413-24.
- Decallonne, B., E. van Etten, A. Giulietti, K. Casteels, L. Overbergh, R. Bouillon, et C. Mathieu. 2003. Defect in activation-induced cell death in non-obese diabetic (NOD) T lymphocytes. *J Autoimmun.* 20:219-26.
- Decker, P., I. Kotter, R. Klein, B. Berner, et H.G. Rammensee. 2006. Monocyte-derived dendritic cells over-express CD86 in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford).* 45:1087-95.
- Deng, T., et M. Karin. 1994. c-Fos transcriptional activity stimulated by H-Ras-activated protein kinase distinct from JNK and ERK. *Nature.* 371:171-5.
- Descombes, P., et U. Schibler. 1991. A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell.* 67:569-79.
- Devendra, D., et G.S. Eisenbarth. 2003. 17. Immunologic endocrine disorders. *J Allergy Clin Immunol.* 111:S624-36.
- DiDonato, J.A., M. Hayakawa, D.M. Rothwarf, E. Zandi, et M. Karin. 1997. A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature.* 388:548-54.
- Dilts, S.M., et K.J. Lafferty. 1999. Autoimmune diabetes: the involvement of benign and malignant autoimmunity. *J Autoimmun.* 12:229-32.
- Ding, D., H. Mehta, W.J. McCune, et M.J. Kaplan. 2006. Aberrant phenotype and function of myeloid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 177:5878-89.
- Engering, A.J., M. Cella, D. Fluitsma, M. Brockhaus, E.C. Hoefsmit, A. Lanzavecchia, et J. Pieters. 1997. The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. *Eur J Immunol.* 27:2417-25.
- Falcone, M., J. Lee, G. Patstone, B. Yeung, et N. Sarvetnick. 1998. B lymphocytes are crucial antigen-presenting cells in the pathogenic autoimmune response to GAD65 antigen in nonobese diabetic mice. *J Immunol.* 161:1163-8.

- Fanger, N.A., K. Wardwell, L. Shen, T.F. Tedder, et P.M. Guyre. 1996. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J Immunol.* 157:541-8.
- Feili-Hariri, M., X. Dong, S.M. Alber, S.C. Watkins, R.D. Salter, et P.A. Morel. 1999. Immunotherapy of NOD mice with bone marrow-derived dendritic cells. *Diabetes.* 48:2300-8.
- Feili-Hariri, M., et P.A. Morel. 2001. Phenotypic and functional characteristics of BM-derived DC from NOD and non-diabetes-prone strains. *Clin Immunol.* 98:133-42.
- Finegood, D.T., L. Scaglia, et S. Bonner-Weir. 1995. Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model. *Diabetes.* 44:249-56.
- Fogg, D.K., C. Sibon, C. Miled, S. Jung, P. Aucouturier, D.R. Littman, A. Cumano, et F. Geissmann. 2006. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science.* 311:83-7.
- Fong, A., et S.C. Sun. 2002. Genetic evidence for the essential role of beta-transducin repeat-containing protein in the inducible processing of NF-kappa B2/p100. *J Biol Chem.* 277:22111-4.
- Foulkes, N.S., et P. Sassone-Corsi. 1992. More is better: activators and repressors from the same gene. *Cell.* 68:411-4.
- Fujino-Kurihara, H., H. Fujita, A. Hakura, K. Nonaka, et S. Tarui. 1985. Morphological aspects on pancreatic islets of non-obese diabetic (NOD) mice. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 49:107-20.
- Gale, E.A. 2002. A missing link in the hygiene hypothesis? *Diabetologia.* 45:588-94.
- Gillespie, K.M. 2006. Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. *Cmaj.* 175:165-70.
- Gonzalez, G.A., et M.R. Montminy. 1989. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell.* 59:675-80.
- Graham, J., W.A. Hagopian, I. Kockum, L.S. Li, C.B. Sanjeevi, R.M. Lowe, J.B. Schaefer, M. Zarghami, H.L. Day, M. Landin-Olsson, J.P. Palmer, M. Janer-Villanueva, L. Hood, G. Sundkvist, A. Lernmark, N. Breslow, G. Dahlquist, et G. Blohme. 2002. Genetic effects on age-dependent onset and islet cell autoantibody markers in type 1 diabetes. *Diabetes.* 51:1346-55.
- Hamilton-Williams, E.E., D.V. Serreze, B. Charlton, E.A. Johnson, M.P. Marron, A. Mullbacher, et R.M. Slattery. 2001. Transgenic rescue implicates beta2-microglobulin as a diabetes susceptibility gene in nonobese diabetic (NOD) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:11533-8.

- Hanafusa, T., J. Miyagawa, H. Nakajima, K. Tomita, M. Kuwajima, Y. Matsuzawa, et S. Tarui. 1994. The NOD mouse. *Diabetes Res Clin Pract.* 24 Suppl:S307-11.
- Hart, D.N. 1997. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood.* 90:3245-87.
- Hartenstein, B., S. Teurich, J. Hess, J. Schenkel, M. Schorpp-Kistner, et P. Angel. 2002. Th2 cell-specific cytokine expression and allergen-induced airway inflammation depend on JunB. *Embo J.* 21:6321-9.
- Hawkes, C.J., C. Wasmeier, M.R. Christie, et J.C. Hutton. 1996. Identification of the 37-kDa antigen in IDDM as a tyrosine phosphatase-like protein (phogrin) related to IA-2. *Diabetes.* 45:1187-92.
- Hayward, A.R., et M. Shreiber. 1989. Neonatal injection of CD3 antibody into nonobese diabetic mice reduces the incidence of insulinitis and diabetes. *J Immunol.* 143:1555-9.
- Hess, J., P. Angel, et M. Schorpp-Kistner. 2004. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci.* 117:5965-73.
- Hill, N.J., P.A. Lyons, N. Armitage, J.A. Todd, L.S. Wicker, et L.B. Peterson. 2000. NOD Idd5 locus controls insulinitis and diabetes and overlaps the orthologous CTLA4/IDDM12 and NRAMP1 loci in humans. *Diabetes.* 49:1744-7.
- Honeyman, M.C., B.S. Coulson, N.L. Stone, S.A. Gellert, P.N. Goldwater, C.E. Steele, J.J. Couper, B.D. Tait, P.G. Colman, et L.C. Harrison. 2000. Association between rotavirus infection and pancreatic islet autoimmunity in children at risk of developing type 1 diabetes. *Diabetes.* 49:1319-24.
- Hsu, W., T.K. Kerppola, P.L. Chen, T. Curran, et S. Chen-Kiang. 1994. Fos and Jun repress transcription activation by NF-IL6 through association at the basic zipper region. *Mol Cell Biol.* 14:268-76.
- Hyoty, H. 2002. Enterovirus infections and type 1 diabetes. *Ann Med.* 34:138-47.
- Inaba, K., M. Inaba, M. Naito, et R.M. Steinman. 1993. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J Exp Med.* 178:479-88.
- Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, et R.M. Steinman. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med.* 176:1693-702.
- Inaba, K., M. Pack, M. Inaba, H. Sakuta, F. Isdell, et R.M. Steinman. 1997. High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *J Exp Med.* 186:665-72.

- Jansen, A., F. Homo-Delarche, H. Hooijkaas, P.J. Leenen, M. Dardenne, et H.A. Drexhage. 1994. Immunohistochemical characterization of monocytes-macrophages and dendritic cells involved in the initiation of the insulinitis and beta-cell destruction in NOD mice. *Diabetes*. 43:667-75.
- Jiang, W., W.J. Swiggard, C. Heufler, M. Peng, A. Mirza, R.M. Steinman, et M.C. Nussenzweig. 1995. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature*. 375:151-5.
- Johnson, P.F., W.H. Landschulz, B.J. Graves, et S.L. McKnight. 1987. Identification of a rat liver nuclear protein that binds to the enhancer core element of three animal viruses. *Genes Dev*. 1:133-46.
- Kamradt, T., et N.A. Mitchison. 2001. Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med*. 344:655-64.
- Katz, J., C. Benoist, et D. Mathis. 1993. Major histocompatibility complex class I molecules are required for the development of insulinitis in non-obese diabetic mice. *Eur J Immunol*. 23:3358-60.
- Kelly, M.A., M.L. Rayner, C.H. Mijovic, et A.H. Barnett. 2003. Molecular aspects of type 1 diabetes. *Mol Pathol*. 56:1-10.
- Kita-Furuyama, M., Y. Nagayama, P. Pichurin, S.M. McLachlan, B. Rapoport, et K. Eguchi. 2003. Dendritic cells infected with adenovirus expressing the thyrotrophin receptor induce Graves' hyperthyroidism in BALB/c mice. *Clin Exp Immunol*. 131:234-40.
- Kitamura, D., J. Roes, R. Kuhn, et K. Rajewsky. 1991. A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature*. 350:423-6.
- Kleijmeer, M.J., M.A. Ossevoort, C.J. van Veen, J.J. van Hellemond, J.J. Neefjes, W.M. Kast, C.J. Melief, et H.J. Geuze. 1995. MHC class II compartments and the kinetics of antigen presentation in activated mouse spleen dendritic cells. *J Immunol*. 154:5715-24.
- Kronin, V., K. Winkel, G. Suss, A. Kelso, W. Heath, J. Kirberg, H. von Boehmer, et K. Shortman. 1996. A subclass of dendritic cells regulates the response of naive CD8 T cells by limiting their IL-2 production. *J Immunol*. 157:3819-27.
- Kukreja, A., G. Cost, J. Marker, C. Zhang, Z. Sun, K. Lin-Su, S. Ten, M. Sanz, M. Exley, B. Wilson, S. Porcelli, et N. Maclaren. 2002. Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest*. 109:131-40.
- Lan, R.Y., A.A. Ansari, Z.X. Lian, et M.E. Gershwin. 2005. Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 4:351-63.



- Landschulz, W.H., P.F. Johnson, et S.L. McKnight. 1988. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*. 240:1759-64.
- LeClair, K.P., M.A. Blonar, et P.A. Sharp. 1992. The p50 subunit of NF-kappa B associates with the NF-IL6 transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:8145-9.
- Leenen, P.J., K. Radosevic, J.S. Voerman, B. Salomon, N. van Rooijen, D. Klatzmann, et W. van Ewijk. 1998. Heterogeneity of mouse spleen dendritic cells: in vivo phagocytic activity, expression of macrophage markers, and subpopulation turnover. *J Immunol*. 160:2166-73.
- Lekstrom-Himes, J.A. 2001. The role of C/EBP(epsilon) in the terminal stages of granulocyte differentiation. *Stem Cells*. 19:125-33.
- Lin, H.H., D.E. Faunce, M. Stacey, A. Terajewicz, T. Nakamura, J. Zhang-Hoover, M. Kerley, M.L. Mucenski, S. Gordon, et J. Stein-Streilein. 2005. The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance. *J Exp Med*. 201:1615-25.
- Long, F., E. Schipani, H. Asahara, H. Kronenberg, et M. Montminy. 2001. The CREB family of activators is required for endochondral bone development. *Development*. 128:541-50.
- Loscher, C.E., E. Draper, O. Leavy, D. Kelleher, K.H. Mills, et H.M. Roche. 2005. Conjugated linoleic acid suppresses NF-kappa B activation and IL-12 production in dendritic cells through ERK-mediated IL-10 induction. *J Immunol*. 175:4990-8.
- Lu, H.T., D.D. Yang, M. Wysk, E. Gatti, I. Mellman, R.J. Davis, et R.A. Flavell. 1999. Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3)-deficient mice. *Embo J*. 18:1845-57.
- Luft, T., E. Maraskovsky, M. Schnurr, K. Knebel, M. Kirsch, M. Gorner, R. Skoda, A.D. Ho, P. Nawroth, et A. Bierhaus. 2004. Tuning the volume of the immune response: strength and persistence of stimulation determine migration and cytokine secretion of dendritic cells. *Blood*. 104:1066-74.
- Lutz, M.B., et G. Schuler. 2002. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol*. 23:445-9.
- Lyons, P.A., W.W. Hancock, P. Denny, C.J. Lord, N.J. Hill, N. Armitage, T. Siegmund, J.A. Todd, M.S. Phillips, J.F. Hess, S.L. Chen, P.A. Fischer, L.B. Peterson, et L.S. Wicker. 2000. The NOD Idd9 genetic interval influences the pathogenicity of insulinitis and contains molecular variants of Cd30, Tnfr2, and Cd137. *Immunity*. 13:107-15.
- Ma, L., S. Qian, X. Liang, L. Wang, J.E. Woodward, N. Giannoukakis, P.D. Robbins, S. Bertera, M. Trucco, J.J. Fung, et L. Lu. 2003. Prevention of diabetes in NOD mice by

administration of dendritic cells deficient in nuclear transcription factor-kappaB activity. *Diabetes*. 52:1976-85.

Maldonado-Lopez, R., T. De Smedt, P. Michel, J. Godfroid, B. Pajak, C. Heirman, K. Thielemans, O. Leo, J. Urbain, et M. Moser. 1999. CD8alpha+ and CD8alpha-subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med*. 189:587-92.

Maraskovsky, E., K. Brasel, M. Teepe, E.R. Roux, S.D. Lyman, K. Shortman, et H.J. McKenna. 1996a. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J Exp Med*. 184:1953-62.

Maraskovsky, E., M. Teepe, P.J. Morrissey, S. Braddy, R.E. Miller, D.H. Lynch, et J.J. Peschon. 1996b. Impaired survival and proliferation in IL-7 receptor-deficient peripheral T cells. *J Immunol*. 157:5315-23.

Martin, E., B. O'Sullivan, P. Low, et R. Thomas. 2003. Antigen-specific suppression of a primed immune response by dendritic cells mediated by regulatory T cells secreting interleukin-10. *Immunity*. 18:155-67.

Mathis, D., L. Vence, et C. Benoist. 2001. beta-Cell death during progression to diabetes. *Nature*. 414:792-8.

Mathur, R.K., A. Awasthi, P. Wadhwa, B. Ramanamurthy, et B. Saha. 2004. Reciprocal CD40 signals through p38MAPK and ERK-1/2 induce counteracting immune responses. *Nat Med*. 10:540-4.

Matsuno, K., T. Ezaki, S. Kudo, et Y. Uehara. 1996. A life stage of particle-laden rat dendritic cells in vivo: their terminal division, active phagocytosis, and translocation from the liver to the draining lymph. *J Exp Med*. 183:1865-78.

Matzinger, P. 2002. The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 296:301-5.

Matzinger, P., et S. Guerder. 1989. Does T-cell tolerance require a dedicated antigen-presenting cell? *Nature*. 338:74-6.

Mayr, B., et M. Montminy. 2001. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:599-609.

Mazzoni, A., et D.M. Segal. 2004. Controlling the Toll road to dendritic cell polarization. *J Leukoc Biol*. 75:721-30.

McGuirk, P., C. McCann, et K.H. Mills. 2002. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. *J Exp Med*. 195:221-31.

- McHugh, R.S., M.J. Whitters, C.A. Piccirillo, D.A. Young, E.M. Shevach, M. Collins, et M.C. Byrne. 2002. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity*. 16:311-23.
- McKnight, A.J., et S. Gordon. 1998. The EGF-TM7 family: unusual structures at the leukocyte surface. *J Leukoc Biol*. 63:271-80.
- Meixner, A., F. Karreth, L. Kenner, et E.F. Wagner. 2004. JunD regulates lymphocyte proliferation and T helper cell cytokine expression. *Embo J*. 23:1325-35.
- Mellman, I., et R.M. Steinman. 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*. 106:255-8.
- Mercurio, F., H. Zhu, B.W. Murray, A. Shevchenko, B.L. Bennett, J. Li, D.B. Young, M. Barbosa, M. Mann, A. Manning, et A. Rao. 1997. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science*. 278:860-6.
- Miyazaki, A., T. Hanafusa, K. Yamada, J. Miyagawa, H. Fujino-Kurihara, H. Nakajima, K. Nonaka, et S. Tarui. 1985. Predominance of T lymphocytes in pancreatic islets and spleen of pre-diabetic non-obese diabetic (NOD) mice: a longitudinal study. *Clin Exp Immunol*. 60:622-30.
- Mommaas, A.M., A.A. Mulder, R. Jordens, C. Out, M.C. Tan, P. Cresswell, P.M. Kluin, et F. Koning. 1999. Human epidermal Langerhans cells lack functional mannose receptors and a fully developed endosomal/lysosomal compartment for loading of HLA class II molecules. *Eur J Immunol*. 29:571-80.
- Montminy, M.R., K.A. Sevarino, J.A. Wagner, G. Mandel, et R.H. Goodman. 1986. Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83:6682-6.
- Nagata, M., P. Santamaria, T. Kawamura, T. Utsugi, et J.W. Yoon. 1994. Evidence for the role of CD8+ cytotoxic T cells in the destruction of pancreatic beta-cells in nonobese diabetic mice. *J Immunol*. 152:2042-50.
- Nerlov, C., et E.B. Ziff. 1994. Three levels of functional interaction determine the activity of CCAAT/enhancer binding protein-alpha on the serum albumin promoter. *Genes Dev*. 8:350-62.
- Nerup, J., P. Platz, O.O. Andersen, M. Christy, J. Lyngsoe, J.E. Poulsen, L.P. Ryder, L.S. Nielsen, M. Thomsen, et A. Svejgaard. 1974. HL-A antigens and diabetes mellitus. *Lancet*. 2:864-6.
- Nikolic, T., G. Bouma, H.A. Drexhage, et P.J. Leenen. 2005. Diabetes-prone NOD mice show an expanded subpopulation of mature circulating monocytes, which preferentially develop into macrophage-like cells in vitro. *J Leukoc Biol*. 78:70-9.

- Nikolic, T., M. Bunk, H.A. Drexhage, et P.J. Leenen. 2004. Bone marrow precursors of nonobese diabetic mice develop into defective macrophage-like dendritic cells in vitro. *J Immunol.* 173:4342-51.
- Ohteki, T., T. Fukao, K. Suzue, C. Maki, M. Ito, M. Nakamura, et S. Koyasu. 1999. Interleukin 12-dependent interferon gamma production by CD8alpha+ lymphoid dendritic cells. *J Exp Med.* 189:1981-6.
- Onkamo, P., S. Vaananen, M. Karvonen, et J. Tuomilehto. 1999. Worldwide increase in incidence of Type I diabetes--the analysis of the data on published incidence trends. *Diabetologia.* 42:1395-403.
- Ouaaz, F., J. Arron, Y. Zheng, Y. Choi, et A.A. Beg. 2002. Dendritic cell development and survival require distinct NF-kappaB subunits. *Immunity.* 16:257-70.
- Pahl, H.L. 1999. Activators et target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene.* 18:6853-66.
- Palmer, J.P., C.M. Asplin, P. Clemons, K. Lyen, O. Tatpati, P.K. Raghu, et T.L. Paquette. 1983. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science.* 222:1337-9.
- Petrik, J., E. Arany, T.J. McDonald, et D.J. Hill. 1998. Apoptosis in the pancreatic islet cells of the neonatal rat is associated with a reduced expression of insulin-like growth factor II that may act as a survival factor. *Endocrinology.* 139:2994-3004.
- Pierre, P., S.J. Turley, E. Gatti, M. Hull, J. Meltzer, A. Mirza, K. Inaba, R.M. Steinman, et I. Mellman. 1997. Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature.* 388:787-92.
- Platzer, B., A. Jorgl, S. Taschner, B. Hochoer, et H. Strobl. 2004. RelB regulates human dendritic cell subset development by promoting monocyte intermediates. *Blood.* 104:3655-63.
- Poli, V. 1998. The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. *J Biol Chem.* 273:29279-82.
- Poligone, B., D.J. Weaver, Jr., P. Sen, A.S. Baldwin, Jr., et R. Tisch. 2002. Elevated NF-kappaB activation in nonobese diabetic mouse dendritic cells results in enhanced APC function. *J Immunol.* 168:188-96.
- Puig-Kroger, A., M. Relloso, O. Fernandez-Capetillo, A. Zubiaga, A. Silva, C. Bernabeu, et A.L. Corbi. 2001. Extracellular signal-regulated protein kinase signaling pathway negatively regulates the phenotypic and functional maturation of monocyte-derived human dendritic cells. *Blood.* 98:2175-82.
- Pulendran, B., J. Lingappa, M.K. Kennedy, J. Smith, M. Teepe, A. Rudensky, C.R. Maliszewski, et E. Maraskovsky. 1997. Developmental pathways of dendritic cells in

vivo: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice. *J Immunol.* 159:2222-31.

Quarantino, S., L.P. Duddy, et M. Londei. 2000. Fully competent dendritic cells as inducers of T cell anergy in autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:10911-6.

Ramji, D.P., et P. Foka. 2002. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J.* 365:561-75.

Regnier, C.H., H.Y. Song, X. Gao, D.V. Goeddel, Z. Cao, et M. Rothe. 1997. Identification and characterization of an IkappaB kinase. *Cell.* 90:373-83.

Reis e Sousa, C., S. Hieny, T. Scharton-Kersten, D. Jankovic, H. Charest, R.N. Germain, et A. Sher. 1997. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med.* 186:1819-29.

Rescigno, M., M. Martino, C.L. Sutherland, M.R. Gold, et P. Ricciardi-Castagnoli. 1998. Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J Exp Med.* 188:2175-80.

Ridgway, W.M., et C.G. Fathman. 1999. MHC structure and autoimmune T cell repertoire development. *Curr Opin Immunol.* 11:638-42.

Risch, N. 1987. Assessing the role of HLA-linked and unlinked determinants of disease. *Am J Hum Genet.* 40:1-14.

Roux, P.P., et J. Blenis. 2004. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68:320-44.

Rubartelli, A., A. Poggi, et M.R. Zocchi. 1997. The selective engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells is mediated by the alpha(v)beta3 integrin and requires intracellular and extracellular calcium. *Eur J Immunol.* 27:1893-900.

Rudolph, D., A. Tafuri, P. Gass, G.J. Hammerling, B. Arnold, et G. Schutz. 1998. Impaired fetal T cell development and perinatal lethality in mice lacking the cAMP response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:4481-6.

Rutella, S., S. Danese, et G. Leone. 2006. Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood.* 108:1435-40.

Saccani, S., S. Pantano, et G. Natoli. 2001. Two waves of nuclear factor kappaB recruitment to target promoters. *J Exp Med.* 193:1351-9.

Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, et A. Lanzavecchia. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med.* 182:389-400.

- Sallusto, F., et A. Lanzavecchia. 2002. The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. *Arthritis Res.* 4 Suppl 3:S127-32.
- Saunders, D., K. Lucas, J. Ismaili, L. Wu, E. Maraskovsky, A. Dunn, et K. Shortman. 1996. Dendritic cell development in culture from thymic precursor cells in the absence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med.* 184:2185-96.
- Scaglia, L., C.J. Cahill, D.T. Finegood, et S. Bonner-Weir. 1997. Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat. *Endocrinology.* 138:1736-41.
- Scheicher, C., M. Mehlig, R. Zecher, et K. Reske. 1992. Dendritic cells from mouse bone marrow: in vitro differentiation using low doses of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol Methods.* 154:253-64.
- Screpanti, I., L. Romani, P. Musiani, A. Modesti, E. Fattori, D. Lazzaro, C. Sellitto, S. Scarpa, D. Bellavia, G. Lattanzio, et et coll. 1995. Lymphoproliferative disorder and imbalanced T-helper response in C/EBP beta-deficient mice. *Embo J.* 14:1932-41.
- Senftleben, U., Y. Cao, G. Xiao, F.R. Greten, G. Krahn, G. Bonizzi, Y. Chen, Y. Hu, A. Fong, S.C. Sun, et M. Karin. 2001. Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science.* 293:1495-9.
- Serreze, D.V., H.D. Chapman, D.S. Varnum, I. Gerling, E.H. Leiter, et L.D. Shultz. 1997. Initiation of autoimmune diabetes in NOD/Lt mice is MHC class I-dependent. *J Immunol.* 158:3978-86.
- Serreze, D.V., H.D. Chapman, D.S. Varnum, M.S. Hanson, P.C. Reifsnyder, S.D. Richard, S.A. Fleming, E.H. Leiter, et L.D. Shultz. 1996. B lymphocytes are essential for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes: analysis of a new "speed congenic" stock of NOD.Ig mu null mice. *J Exp Med.* 184:2049-53.
- Serreze, D.V., S.A. Fleming, H.D. Chapman, S.D. Richard, E.H. Leiter, et R.M. Tisch. 1998. B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol.* 161:3912-8.
- Shevach, E.M. 2001. Certified professionals: CD4(+)CD25(+) suppressor T cells. *J Exp Med.* 193:F41-6.
- Shimizu, J., S. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida, et S. Sakaguchi. 2002. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol.* 3:135-42.
- Shizuru, J.A., et C.G. Fathman. 1993. Anti-CD4 antibodies in diabetes. *Immunol Ser.* 59:237-52.

- Short, J.M., A. Wynshaw-Boris, H.P. Short, et R.W. Hanson. 1986. Characterization of the phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) promoter-regulatory region. II. Identification of cAMP and glucocorticoid regulatory domains. *J Biol Chem.* 261:9721-6.
- Solan, N.J., H. Miyoshi, E.M. Carmona, G.D. Bren, et C.V. Paya. 2002. RelB cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100. *J Biol Chem.* 277:1405-18.
- Solimena, M., R. Dirkx, Jr., J.M. Hermel, S. Pleasic-Williams, J.A. Shapiro, L. Caron, et D.U. Rabin. 1996. ICA 512, an autoantigen of type I diabetes, is an intrinsic membrane protein of neurosecretory granules. *Embo J.* 15:2102-14.
- Solomon, M., et N. Sarvetnick. 2004. The pathogenesis of diabetes in the NOD mouse. *Adv Immunol.* 84:239-64.
- Steinman, R.M., et H. Hemmi. 2006. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol.* 311:17-58.
- Steinman, R.M., S. Turley, I. Mellman, et K. Inaba. 2000. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med.* 191:411-6.
- Suss, G., et K. Shortman. 1996. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J Exp Med.* 183:1789-96.
- Tan, M.C., A.M. Mommaas, J.W. Drijfhout, R. Jordens, J.J. Onderwater, D. Verwoerd, A.A. Mulder, A.N. van der Heiden, D. Scheidegger, L.C. Oomen, T.H. Ottenhoff, A. Tulp, J.J. Neefjes, et F. Koning. 1997. Mannose receptor-mediated uptake of antigens strongly enhances HLA class II-restricted antigen presentation by cultured dendritic cells. *Eur J Immunol.* 27:2426-35.
- Tanaka, T., S. Akira, K. Yoshida, M. Umemoto, Y. Yoneda, N. Shirafuji, H. Fujiwara, S. Suematsu, N. Yoshida, et T. Kishimoto. 1995. Targeted disruption of the NF-IL6 gene discloses its essential role in bacteria killing and tumor cytotoxicity by macrophages. *Cell.* 80:353-61.
- Tang, J.G., et H.P. Koeffler. 2001. Structural and functional studies of CCAAT/enhancer-binding protein epsilon. *J Biol Chem.* 276:17739-46.
- Tang, Q., J.Y. Adams, A.J. Tooley, M. Bi, B.T. Fife, P. Serra, P. Santamaria, R.M. Locksley, M.F. Krummel, et J.A. Bluestone. 2006. Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat Immunol.* 7:83-92.
- Todd, J.A. 1995. Genetic analysis of type 1 diabetes using whole genome approaches. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:8560-5.
- Todryk, S., A.A. Melcher, N. Hardwick, E. Linardakis, A. Bateman, M.P. Colombo, A. Stoppacciaro, et R.G. Vile. 1999. Heat shock protein 70 induced during tumor cell killing induces Th1 cytokines and targets immature dendritic cell precursors to enhance antigen uptake. *J Immunol.* 163:1398-408.

Trudeau, J.D., J.P. Dutz, E. Arany, D.J. Hill, W.E. Fieldus, et D.T. Finegood. 2000. Neonatal beta-cell apoptosis: a trigger for autoimmune diabetes? *Diabetes*. 49:1-7.

Ueda, H., J.M. Howson, L. Esposito, J. Heward, H. Snook, G. Chamberlain, D.B. Rainbow, K.M. Hunter, A.N. Smith, G. Di Genova, M.H. Herr, I. Dahlman, F. Payne, D. Smyth, C. Lowe, R.C. Twells, S. Howlett, B. Healy, S. Nutland, H.E. Rance, V. Everett, L.J. Smink, A.C. Lam, H.J. Cordell, N.M. Walker, C. Bordin, J. Hulme, C. Motzo, F. Cucca, J.F. Hess, M.L. Metzker, J. Rogers, S. Gregory, A. Allahabadia, R. Nithiyananthan, E. Tuomilehto-Wolf, J. Tuomilehto, P. Bingley, K.M. Gillespie, D.E. Undlien, K.S. Ronningen, C. Guja, C. Ionescu-Tirgoviste, D.A. Savage, A.P. Maxwell, D.J. Carson, C.C. Patterson, J.A. Franklyn, D.G. Clayton, L.B. Peterson, L.S. Wicker, J.A. Todd, et S.C. Gough. 2003. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*. 423:506-11.

Vallejo, M., D. Ron, C.P. Miller, et J.F. Habener. 1993. C/ATF, a member of the activating transcription factor family of DNA-binding proteins, dimerizes with CAAT/enhancer-binding proteins and directs their binding to cAMP response elements. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:4679-83.

van den Berg, T.K., et G. Kraal. 2005. A function for the macrophage F4/80 molecule in tolerance induction. *Trends Immunol*. 26:506-9.

Vigouroux, S., E. Yvon, E. Biagi, et M.K. Brenner. 2004. Antigen-induced regulatory T cells. *Blood*. 104:26-33.

Vremec, D., et K. Shortman. 1997. Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *J Immunol*. 159:565-73.

Vremec, D., M. Zorbas, R. Scollay, D.J. Saunders, C.F. Ardavin, L. Wu, et K. Shortman. 1992. The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J Exp Med*. 176:47-58.

Wakkach, A., N. Fournier, V. Brun, J.P. Breitmayer, F. Cottrez, et H. Groux. 2003. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity*. 18:605-17.

Watanabe, N., Y.H. Wang, H.K. Lee, T. Ito, Y.H. Wang, W. Cao, et Y.J. Liu. 2005. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in human thymus. *Nature*. 436:1181-5.

Weaver, D.J., Jr., B. Poligone, T. Bui, U.M. Abdel-Motal, A.S. Baldwin, Jr., et R. Tisch. 2001. Dendritic cells from nonobese diabetic mice exhibit a defect in NF-kappa B regulation due to a hyperactive I kappa B kinase. *J Immunol*. 167:1461-8.



- Weih, F., D. Carrasco, S.K. Durham, D.S. Barton, C.A. Rizzo, R.P. Ryseck, S.A. Lira, et R. Bravo. 1995. Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF-kappa B/Rel family. *Cell*. 80:331-40.
- Whitmarsh, A.J., et R.J. Davis. 1996. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med*. 74:589-607.
- Wicker, L.S., B.J. Miller, L.Z. Coker, S.E. McNally, S. Scott, Y. Mullen, et M.C. Appel. 1987. Genetic control of diabetes and insulinitis in the nonobese diabetic (NOD) mouse. *J Exp Med*. 165:1639-54.
- Williams, S.C., M. Baer, A.J. Dillner, et P.F. Johnson. 1995. CRP2 (C/EBP beta) contains a bipartite regulatory domain that controls transcriptional activation, DNA binding and cell specificity. *Embo J*. 14:3170-83.
- Williamson, E.A., H.N. Xu, A.F. Gombart, W. Verbeek, A.M. Chumakov, A.D. Friedman, et H.P. Koeffler. 1998. Identification of transcriptional activation and repression domains in human CCAAT/enhancer-binding protein epsilon. *J Biol Chem*. 273:14796-804.
- Winzler, C., P. Rovere, M. Rescigno, F. Granucci, G. Penna, L. Adorini, V.S. Zimmermann, J. Davoust, et P. Ricciardi-Castagnoli. 1997. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J Exp Med*. 185:317-28.
- Wong, F.S., I. Visintin, L. Wen, J. Granata, R. Flavell, et C.A. Janeway. 1998. The role of lymphocyte subsets in accelerated diabetes in nonobese diabetic-rat insulin promoter-B7-1 (NOD-RIP-B7-1) mice. *J Exp Med*. 187:1985-93.
- Wong, S., S. Guerder, I. Visintin, E.P. Reich, K.E. Swenson, R.A. Flavell, et C.A. Janeway, Jr. 1995. Expression of the co-stimulator molecule B7-1 in pancreatic beta-cells accelerates diabetes in the NOD mouse. *Diabetes*. 44:326-9.
- Wu, L., A. D'Amico, K.D. Winkel, M. Suter, D. Lo, et K. Shortman. 1998. RelB is essential for the development of myeloid-related CD8alpha- dendritic cells but not of lymphoid-related CD8alpha+ dendritic cells. *Immunity*. 9:839-47.
- Wu, L., C.L. Li, et K. Shortman. 1996. Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. *J Exp Med*. 184:903-11.
- Xiao, G., A. Fong, et S.C. Sun. 2004. Induction of p100 processing by NF-kappaB-inducing kinase involves docking IkappaB kinase alpha (IKKalpha) to p100 and IKKalpha-mediated phosphorylation. *J Biol Chem*. 279:30099-105.
- Xiao, G., E.W. Harhaj, et S.C. Sun. 2001. NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol Cell*. 7:401-9.

- Xiao, G., A.B. Rabson, W. Young, G. Qing, et Z. Qu. 2006. Alternative pathways of NF-kappaB activation: a double-edged sword in health and disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17:281-93.
- Xie, J., J. Qian, S. Wang, M.E. Freeman, 3rd, J. Epstein, et Q. Yi. 2003. Novel and detrimental effects of lipopolysaccharide on in vitro generation of immature dendritic cells: involvement of mitogen-activated protein kinase p38. *J Immunol.* 171:4792-800.
- Yamanaka, R., G.D. Kim, H.S. Radomska, J. Lekstrom-Himes, L.T. Smith, P. Antonson, D.G. Tenen, et K.G. Xanthopoulos. 1997. CCAAT/enhancer binding protein epsilon is preferentially up-regulated during granulocytic differentiation and its functional versatility is determined by alternative use of promoters and differential splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:6462-7.
- Yanagawa, Y., et K. Onoe. 2006. Distinct regulation of CD40-mediated interleukin-6 and interleukin-12 productions via mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappaB-inducing kinase in mature dendritic cells. *Immunology.* 117:526-35.
- Yang, Y., et P. Santamaria. 2006. Lessons on autoimmune diabetes from animal models. *Clin Sci (Lond).* 110:627-39.
- Yao, Y., Q. Xu, M.J. Kwon, R. Matta, Y. Liu, S.C. Hong, et C.H. Chang. 2006. ERK and p38 MAPK signaling pathways negatively regulate CIITA gene expression in dendritic cells and macrophages. *J Immunol.* 177:70-6.
- Yoshimura, S., J. Bondeson, F.M. Brennan, B.M. Foxwell, et M. Feldmann. 2001. Role of NFkappaB in antigen presentation and development of regulatory T cells elucidated by treatment of dendritic cells with the proteasome inhibitor PSI. *Eur J Immunol.* 31:1883-93.
- Yu, Q., C. Kovacs, F.Y. Yue, et M.A. Ostrowski. 2004. The role of the p38 mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase, and phosphoinositide-3-OH kinase signal transduction pathways in CD40 ligand-induced dendritic cell activation and expansion of virus-specific CD8+ T cell memory responses. *J Immunol.* 172:6047-56.
- Yvon, E.S., S. Vigouroux, R.F. Rousseau, E. Biagi, P. Amrolia, G. Dotti, H.J. Wagner, et M.K. Brenner. 2003. Overexpression of the Notch ligand, Jagged-1, induces alloantigen-specific human regulatory T cells. *Blood.* 102:3815-21.